

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 10 月 16 日 (16.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/085119 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12P 21/08, C12N 15/09, 5/10, C07K 16/18, G01N 33/50, C07K 16/46 // A61K 39/395, A61P 9/00, 29/00, 31/04, 31/12, 31/14, 35/00, 37/02, 37/04, 37/08, 43/00, G01N 33/15, (C12P 21/08, C12R 1:91) (C12N 5/10, C12R 1:91)

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/04504

(22) 国際出願日: 2003 年 4 月 9 日 (09.04.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-106950 2002 年 4 月 9 日 (09.04.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和  
酸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO.,  
LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一  
丁目 6 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中村 和靖 (NAKA-  
MURA, Kazuyasu) [JP/US]; 20852 メリーランド州ノー  
スベセスダニコルソンレーン 5801 アパー  
トメントナンバー 416 MD (US). 設楽 研也 (SHI-  
TARA, Kenya) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭町  
三丁目 6 番 6 号 協和酸酵工業株式会社 東京研究所  
内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI, Shohei et al.); 〒107-  
6028 東京都港区赤坂一丁目 1 2 番 3 2 号 アーク森  
ビル 2 8 階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,  
NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された  
生物材料の寄託に関する表示。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ENHANCING ACTIVITY OF ANTIBODY COMPOSITION OF BINDING TO Fc  $\gamma$  RECEPTOR IIIa

(54) 発明の名称: 抗体組成物の Fc  $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を高める方法

(57) Abstract: A method of enhancing the activity of an antibody of binding to Fc  $\gamma$  receptor IIIa; a method of enhancing the antibody-dependent cytotoxic activity of an antibody composition; a method of detecting the ratio of sugar chains having no fucose bonded to N-acetylglucosamine at the sugar chain reducing end among total N-glycoside bond-type complex sugar chains binding to the Fc region contained in an antibody composition; a method of detecting an antibody-dependent cytotoxic activity; an Fc-fused protein composition produced with the use of cells having tolerance to a lectin recognizing a sugar chain structure in which an  $\alpha$ -bond is formed between the 6-position of N-acetylglucosamine at the reducing end of an N-glycoside bond-type complex sugar chain and the 1-position of fucose; and a process for producing the same.

(57) 要約: 抗体組成物の Fc  $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を高める方法、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法、抗体依存性細胞障害活性を検出する方法、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を用いて製造された Fc 融合蛋白質組成物、およびその製造方法。



WO 03/085119 A1

## 明 細 書

抗体組成物の Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を高める方法

## 技術分野

本発明は、抗体組成物の Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を高める方法、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法、抗体組成物の Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を高められた抗体組成物を製造する方法、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を用いて製造された Fc 融合蛋白質組成物、およびその製造方法に関する。

## 背景技術

抗体は、高い結合活性、結合特異性および血中での高い安定性を有することから、ヒトの各種疾患の診断、予防および治療への応用が試みられてきた [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。また、遺伝子組換え技術を利用して、ヒト以外の動物の抗体からヒト型キメラ抗体或いはヒト型相補性決定領域（以下、CDR と表記する）移植抗体の様なヒト化抗体を作製することが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体 V 領域（以下、V 領域と表記する）がヒト以外の動物の抗体で、定常領域（以下、C 領域と表記する）がヒト抗体である抗体である。ヒト型 CDR 移植抗体とは、ヒト抗体の CDR をヒト以外の動物の抗体の CDR と置換した抗体である。

哺乳類の抗体には、IgM、IgD、IgG、IgA、IgE の 5 種類のクラスが存在することが明らかとなっているが、ヒトの各種疾患の診断、予防および治療には血中半減期が長く、各種エフェクター機能を有する等の機能特性からヒト IgG クラスの抗体が主として利用されている [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 1 (1995)]。ヒト IgG クラスの抗体は、更に IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 の 4 種類のサブクラスに分類されている。IgG

クラスの抗体のエフェクター機能である抗体依存性細胞障害活性（以下、ADCC 活性と表記する）や補体依存性細胞障害活性（以下、CDC 活性と表記する）については、これまでに多数の研究が行われ、ヒト IgG クラスでは、IgG1 サブクラスの抗体が最も高い ADCC 活性、CDC 活性を有していることが報告されている [ケミカル・イムノロジー (Chemical Immunology), 65, 88 (1997)]。以上の観点から、市販のリツキサン、ハーセプチンを始めとして、その効果発現に高いエフェクター機能を必要とする抗腫瘍ヒト化抗体の殆どはヒト IgG1 サブクラスの抗体である。

ヒト IgG1 サブクラスの抗体の ADCC 活性および CDC 活性の発現には、抗体 Fc 領域と、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在する抗体レセプター（以下、Fc $\gamma$ R と表記する）および各種補体成分との結合が必要であり、その結合については、抗体のヒンジ領域および C 領域の第 2 番目のドメイン（以下、CH2 ドメインと表記する）内のいくつかのアミノ酸残基の重要性 [ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・イムノロジー (Eur. J. Immunol.), 23, 1098 (1993)、イムノロジー (Immunology), 86, 319 (1995)、ケミカル・イムノロジー (Chemical Immunology), 65, 88 (1997)] の他、CH2 ドメインに結合している糖鎖の重要性 [ケミカル・イムノロジー (Chemical Immunology), 65, 88 (1997)] が示唆されている。

糖鎖に関しては、ボイド (Boyd) らは、チャイニーズハムスター卵巣細胞（以下、CHO 細胞と表記する）或いはマウスミエローマ NS0 細胞（以下、NS0 細胞と表記する）で生産したヒト型 CDR 移植抗体 CAMPATH-1H（ヒト IgG1 サブクラス）を各種糖分解酵素で処理し、糖鎖の ADCC 活性、CDC 活性に対する影響を検討した結果、非還元末端のシアル酸の除去は、両活性に影響を与えないが、更にガラクトース残基を除去することで CDC 活性のみが影響を受け、約 50% 程度活性が低下すること、糖鎖の完全な除去は、両活性を消失させることを報告した [モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunol.), 32, 1311 (1995)]。また、ライフリー (Lifely) らは、CHO 細胞、NS0 細胞或いはラットミエローマ Y0 細胞（以下、Y0 細胞と表記する）で生産したヒト型 CDR 移植抗体 CAMPATH-1H（ヒト IgG1 サブクラス）の糖鎖の分析および ADCC 活性を測定した結果、Y0 細胞由来の CAMPATH-1H が最も高い ADCC 活性を示し、その活性にはバイセクティングに位置する N-アセチルグルコサミン（以下、GlcNAc と表記する）が重要であることを示唆した [グリコバイオロジー (Glycobiology), 5, 813 (1995) : W099/54342]。これらの報告は、ヒト IgG1 サブクラスの抗体のエフェクター機能に糖鎖の構造が極めて重要な

役割を果たしており、糖鎖の構造を変えることでより高いエフェクター機能を有する抗体を作製することが可能であることを示している。しかし、実際には糖鎖の構造は多様かつ複雑であり、エフェクター機能に真に重要な構造を特定できたとは言い難い。

以上のように、IgG クラスの抗体の CH2 ドメインに結合している糖鎖は、抗体のエフェクター機能の発現に大きな影響を与える。先にも述べたように、抗体のエフェクター機能のいくつかは、エフェクター細胞表面上に存在する Fc $\gamma$ R との相互作用を介して発揮される[アニュアル・レビュー・オブ・免疫ノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 18, 709 (2000)、アニュアル・レビュー・オブ・免疫ノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 19, 275 (2001)]。

Fc $\gamma$ R は、3 つの異なるクラスが存在することが明らかとなっており、それぞれ Fc $\gamma$ RI (CD64)、Fc $\gamma$ RII (CD32)、Fc $\gamma$ RIII (CD16) と呼ばれている。ヒトにおいては、Fc $\gamma$ RII と Fc $\gamma$ RIII は、さらに、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb と Fc $\gamma$ RIIIa、Fc $\gamma$ RIIIb に分類される。Fc $\gamma$ R は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する膜蛋白質であり、Fc $\gamma$ RII と Fc $\gamma$ RIII は、2 つのイムノグロブリン様ドメイン、Fc $\gamma$ RI は、3 つのイムノグロブリン様ドメインからなる細胞外領域を持つ  $\alpha$  鎖を構成成分として持ち、 $\alpha$  鎖が IgG 結合活性を担っている。さらに、Fc $\gamma$ RI と Fc $\gamma$ RIII は、 $\alpha$  鎖と会合してシグナル伝達機能を有する  $\gamma$  鎖あるいは  $\zeta$  鎖を構成成分として有している[アニュアル・レビュー・オブ・免疫ノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 18, 709 (2000)、アニュアル・レビュー・オブ・免疫ノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 19, 275 (2001)]。

Fc $\gamma$ RI は、 $10^8 \sim 10^9 \text{M}^{-1}$  の結合定数（以下、 $K_A$  と表記する）を持つ高親和性受容体であり、単量体の IgG に対しても高い結合活性を有している[アナルズ・オブ・ヘマトロジー (Ann. Hematol.), 76, 231 (1998)]。一方、Fc $\gamma$ RII と Fc $\gamma$ RIII は、単量体の IgG に対しては、 $10^5 \sim 10^7 \text{M}^{-1}$  の低い  $K_A$  を示す低親和性受容体であり、抗原などと結合して多量体化した IgG 免疫複合体と効率的に結合する[アナルズ・オブ・ヘマトロジー (Ann. Hematol.), 76, 231 (1998)]。Fc $\gamma$ R は、その機能から、活性化受容体と抑制性受容体に分けられる[アニュアル・レビュー・オブ・免疫ノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 19, 275 (2001)]。

活性化受容体は、 $\alpha$  鎖あるいは会合する  $\gamma$  鎖、 $\zeta$  鎖の細胞内領域に immunoreceptor tyrosine-based activation motif（以下、ITAM と表記する）と呼ばれる 19 アミノ酸残基からなる配列が存在する。IgG 免疫複合体の結合に伴っ



て ITAM と相互作用する Src や Syk などのチロシンキナーゼが活性化して、種々の活性化反応が惹起される。

抑制性受容体は、 $\alpha$  鎖の細胞内領域に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (以下、ITIM と表記する) と呼ばれる 13 アミノ酸残基からなる配列が存在する。活性化受容体との会合を介して ITIM がリン酸化されることにより、SHIP と呼ばれるホスファターゼの活性化を始めとして種々の反応が惹起され、活性化受容体からの活性化シグナルを抑制する。

ヒトでは、高親和性の  $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  および低親和性の  $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$ 、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  は、活性化受容体として機能している。 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  は、会合している  $\gamma$  鎖の細胞内領域に ITAM 配列が存在している。 $\text{Fc}\gamma\text{RI}$  は、マクロファージ、単球、樹状細胞、好中球、好酸球などに発現している。 $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$  は、単一の  $\alpha$  鎖からなり、細胞内領域に ITAM 様配列が存在している。 $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$  は、マクロファージ、マスト細胞、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、好中球、好酸球、血小板および一部の B 細胞に発現している。 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  は、会合している  $\gamma$  鎖あるいは  $\delta$  鎖の細胞内領域に ITAM 配列が存在し、NK 細胞、マクロファージ、単球、マスト細胞、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、好酸球などに発現しているが、好中球、B 細胞および T 細胞には発現していない。

一方、低親和性受容体の  $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$  は、単一の  $\alpha$  鎖からなり、細胞外領域のアミノ酸配列において  $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$  と約 90% の相同性を有する。しかしながら、細胞内領域に ITIM 配列が存在し、抑制性受容体として機能している。 $\text{Fc}\gamma\text{RIIb}$  は、B 細胞、マクロファージ、マスト細胞、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、好塩基球、好中球、好酸球に発現しているが、NK 細胞や T 細胞には発現していない。 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$  は、単一の  $\alpha$  鎖からなり、細胞外領域のアミノ酸配列において  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  と約 95% の相同性を有する。しかしながら、グリコシルホスファチジルイノシトール (以下、GPI と表記する) 結合型の膜蛋白質として、好中球に特異的に発現している。 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIb}$  は、IgG 免疫複合体を結合するが、単独では細胞を活性化できず、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$  などの ITAM 配列を有する受容体との会合を介して機能していると考えられている。このように、生体内における IgG クラスの抗体のエフェクター機能は、様々なエフェクター細胞上に発現している活性化および抑制性の  $\text{Fc}\gamma\text{R}$  との複雑な相互作用の結果、発揮されている。

IgG クラスの抗体のエフェクター機能の 1 つである ADCC 活性は、NK 細胞、好中球、単球、マクロファージなどのエフェクター細胞の活性化の結果、生じると考

えられており、中でも NK 細胞が、主要な役割を果たしている[ブラッド (Blood), 76, 2421 (1990)、トレンズ・イン・イムノロジー (Trends in Immunol.), 22, 633 (2001)、インターナショナル・レビューズ・オブ・イムノロジー (Int. Rev. Immunol.), 20, 503 (2001)]。

NK 細胞上に発現している  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  は、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  である。したがって、NK 細胞に発現している  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  からの活性化シグナルを増強させることにより、ADCC 活性を高めることができると考えられている。

Fc 融合蛋白質としては、Etanercept (商品名 Enbrel、Immunex 社製) (USP 5,605,690)、Alefacept (商品名 Amevive、Biogen 社製) (USP 5,914,111) などが知られている。また、抗体の CH2 ドメインが存在しなければ ADCC 活性を有しないことが知られている (J. Immunol., 152, 2753(1994))。

#### 発明の開示

本発明は、以下の (1)～(48) に関する。

(1) 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物の  $\text{Fc}\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を高める方法。

(2) 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の修飾が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖を抗体分子の Fc 領域に結合させることである、(1) に記載の方法。

(3) 糖鎖が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞が合成する糖鎖であることを特徴とする、(1 または 2) に記載の方法。

(4) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(3) に記載の方法。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する蛋白質；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する蛋白質；

(c) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。

(5) 細胞が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞である、(3) または (4) に記載の方法。

(6) 細胞が、少なくとも、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、(3)～(5) のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) レンズマメレクチン；
- (b) エンドウマメレクチン；
- (c) ソラマメレクチン；
- (d) ヒイロチャワソタケレクチン。

(7) 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、(3)～(6) のいずれか 1 項に記載の方法。

(8) 細胞が、以下の (a)～(i) からなる群から選ばれる細胞である、(3)～(7) のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL. P2. G11. 16Ag. 20 細胞；
- (c) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞
- (e) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞
- (f) ハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

(9) 抗体分子が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる抗体分子である、(1)～(8) のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) ヒト抗体；
- (b) ヒト化抗体；
- (c) (a) または (b) の Fc 領域を含む抗体の断片；
- (d) (a) または (b) の Fc 領域を有する融合蛋白質。

(10) 抗体分子のクラスが IgG である、(1)～(9) のいずれか 1 項に記載の方法。

(11) 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖において、全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミン

の 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が 20%以上である、(1)～(10) のいずれか 1 項に記載の方法。

(12) (1)～(11) のいずれか 1 項に記載の方法により、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法。

(13) 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物の Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性が高められた抗体組成物を製造する方法。

(14) 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の修飾が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖を抗体分子の Fc 領域に結合させることである、(13) に記載の方法。

(15) 糖鎖が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞が合成する糖鎖であることを特徴とする、(13) または (14) に記載の方法。

(16) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、(15) に記載の方法。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する蛋白質；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する蛋白質；

(c) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。

(17) 細胞が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞である、(15) または (16) に記載の方法。

(18) 細胞が、少なくとも、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、(15)～(17) のいずれか 1 項に記載の方法。

(a) レンズマメレクチン；

(b) エンドウマメレクチン；

(c) ソラマメレクチン；

(d) ヒイロチャワンタケレクチン。

(19) 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、(15)～(18) のいずれか 1 項に記載の方法。

(20) 細胞が、以下の (a)～(i) からなる群から選ばれる細胞である、(15)～(19) のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞；
- (c) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞
- (e) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞
- (f) ハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

(21) 抗体分子が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる抗体分子である、(13)～(20) のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) ヒト抗体；
- (b) ヒト化抗体；
- (c) (a) または (b) の Fc 領域を含む抗体の断片；
- (d) (a) または (b) の Fc 領域を有する融合蛋白質。

(22) 抗体分子のクラスが IgG である、(13)～(21) のいずれか 1 項に記載の方法。

(23) 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖において、全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が 20%以上である、(13)～(22) のいずれか 1 項に記載の方法。

(24) (12) の方法を含む、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を製造する方法。

(25) (13)～(24) のいずれか 1 項に記載の製造方法により製造される抗体組成物。

(26) 抗原と被験抗体組成物とを反応させて抗原と抗体組成物の複合体を形成し、該複合体を Fc $\gamma$  受容体 IIIa と接触させて Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物中の糖鎖の割合と Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物中に含まれる Fc 領域

に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法。

(27) 抗原と被験抗体組成物とを反応させ、抗原と抗体組成物の複合体を形成し、該複合体を Fc $\gamma$  受容体 IIIa と接触させ、Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性と Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を検出する方法。

(28) 被験抗体組成物と Fc $\gamma$  受容体 IIIa とを接触させ、抗体組成物と Fc $\gamma$  受容体 IIIa との結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物中の糖鎖の割合と Fc $\gamma$  受容体 IIIa との結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法。

(29) 被験抗体組成物と Fc $\gamma$  受容体 IIIa とを接触させ、抗体組成物と Fc $\gamma$  受容体 IIIa との結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性と Fc $\gamma$  受容体 IIIa との結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を検出する方法。

(30) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を用いて製造された Fc 融合蛋白質組成物。

(31) 細胞が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質の活性が低下または欠失した細胞である、(30) に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素蛋白質；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素蛋白質；

(c) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。

(32) 細胞が、少なくとも、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、(30) または (31) 記載の Fc 融合蛋白質組成物。

(a) レンズマメレクチン；

(b) エンドウマメレクチン；

(c) ソラマメレクチン；

(d) ヒイロチャワンタケレクチン。

(33) 細胞が、Fc 融合蛋白質をコードする遺伝子を導入した細胞である、(30)～(32) のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

(34) Fc が抗体分子の IgG クラス由来である、(33) に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

(35) 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、(30)～(34) のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

(36) 細胞が、マウスミエローマ細胞である、(30)～(35) のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

(37) マウスミエローマ細胞が、NS0 細胞または SP2/0-Ag14 細胞である (36) 記載の Fc 融合蛋白質組成物。

(38) 細胞が、以下の (a)～(g) からなる群から選ばれる細胞である、(30)～(37) のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

(a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；

(b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL. P2. G11. 16Ag. 20 細胞；

(c) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(d) 抗体を生産するハイブリドーマ細胞；

(e) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；

(f) 胚性幹細胞；

(g) 受精卵細胞。

(39) N-グリコシド結合複合型糖鎖を抗体分子の Fc 領域に有する Fc 融合蛋白質からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である Fc 融合蛋白質組成物。

(40) フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に  $\alpha$  結合していない糖鎖である、(39) 記載の Fc 融合蛋白質組成物。

(41) 抗体分子のクラスが IgG である、(39) または (40) 記載の Fc 融合蛋白質組成物。

(42) Fc 融合蛋白質組成物が、Fc 融合繊維芽細胞増殖因子-8 である (30)～(41) のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

- (43) (30)～(42)のいずれか1項に記載のFc融合蛋白質組成物を生産する細胞。
- (44) 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる、(43)に記載の細胞。
- (45) 細胞が、マウスミエローマ細胞である、(43)または(44)に記載の細胞。
- (46) マウスミエローマ細胞が、NS0細胞またはSP2/0-Ag14細胞である(45)に記載の細胞。
- (47) 細胞が、以下の(a)～(g)からなる群から選ばれる細胞である、(43)～(46)のいずれか1項に記載の細胞。
- (a) チャイニーズハムスター卵巢組織由来CHO細胞；
  - (b) ラットミエローマ細胞株YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞；
  - (c) シリアンハムスター腎臓組織由来BHK細胞；
  - (d) 抗体を生産するハイブリドーマ細胞；
  - (e) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
  - (f) 胚性幹細胞；
  - (g) 受精卵細胞。
- (48) (43)～(47)のいずれか1項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中にFc融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該培養物からFc融合蛋白質組成物を採取する工程を含む、Fc融合蛋白質組成物の製造方法。

本発明は、抗体分子のFc領域に結合するN-グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物のFc $\gamma$ 受容体IIIaに対する結合活性を高める方法に関する。

本発明において、抗体分子とは、抗体のFc領域を含む分子であればいかなる分子も包含される。具体的には、抗体、抗体の断片、Fc領域を有する融合蛋白質などをあげることができる。

抗体とは、外来抗原刺激の結果、免疫反応によって生体内に産生される蛋白質で、抗原と特異的に結合する活性を有するものをいう。抗体としては動物に抗原を免疫し、免疫動物の脾臓細胞より作製したハイブリドーマ細胞が分泌する抗体のほか、遺伝子組換え技術により作製された抗体、すなわち、抗体遺伝子を挿入した抗体発現ベクターを、宿主細胞へ導入することにより取得された抗体などがあげられる。具体的には、ハイブリドーマが生産する抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体などをあげることができる。



ハイブリドーマとは、ヒト以外の哺乳動物に抗原を免疫して取得された B 細胞と、マウス等に由来するミエローマ細胞とを細胞融合させて得られる、所望の抗原特異性を有したモノクローナル抗体を産生する細胞を意味する。

ヒト化抗体としては、ヒト型キメラ抗体、ヒト型 CDR 移植抗体などがあげられる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体重鎖 V 領域（以下、重鎖は H 鎖として HV または VH とともに表記する）および抗体軽鎖 V 領域（以下、軽鎖は L 鎖として LV または VL とともに表記する）とヒト抗体の H 鎖 C 領域（以下、CH とともに表記する）およびヒト抗体の軽鎖 C 領域（以下、CL とともに表記する）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体 CH およびヒト抗体 CL をコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型キメラ抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIg と表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、更に hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体の CL としては、hIg に属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$  クラスあるいは  $\lambda$  クラスのものをを用いることができる。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列をヒト抗体の VH および VL の適切な位置に移植した抗体を意味する。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR 配列を任意のヒト抗体の VH および VL の CDR 配列に移植した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH およびヒト抗体の CL をコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型 CDR 移植抗体の CH としては、hIg に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、更に hIgG クラスに属する hIgG1、hIgG2、hIgG3、

hIgG4 といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型 CDR 移植抗体の CL としては、hIg に属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$ クラスあるいは  $\lambda$ クラスのものをを用いることができる。

ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体を意味するが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーならびにヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物あるいはヒト抗体産生トランスジェニック植物から得られる抗体等も含まれる。

ヒト体内に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EB ウィルス等を感染させ不死化、クローニングすることにより、ヒト抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養物中よりヒト抗体を精製することができる。

ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、更に遺伝子工学的手法により、2 本の完全な H 鎖および 2 本の完全な L 鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。

ヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組み込まれた動物を意味する。具体的には、マウス ES 細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該 ES 細胞を他のマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。また、動物の受精卵にヒト抗体遺伝子を導入し、該受精卵を発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物を作製することもできる。ヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物からのヒト抗体の作製方法は、通常のヒト以外の哺乳動物で行われているハイブリドーマ作製方法によりヒト抗体産生ハイブリドーマを得、培養することで培養物中にヒト抗体を産生蓄積させることができる。

トランスジェニック非ヒト動物としては、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サルまたはウサギ等があげられる。

また、本発明において、抗体が、腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、自己免疫疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウィルスあるいは

細菌感染に関連する抗原を認識する抗体であることが好ましく、抗体のクラスは IgG であることが好ましい。

抗体の断片は、上記抗体の少なくとも Fc 領域の一部を含んだ断片をいう。Fc 領域とは、抗体の H 鎖の C 末端側の領域、CH2 領域および CH3 領域を意味し、天然型およびその変異型を包含する。少なくとも Fc 領域の一部とは、好ましくは CH2 領域を含む断片、より好ましくは CH2 領域内に存在する 1 番目のアスパラギン酸を含む領域をいう。IgG クラスの Fc 領域は、カバット (Kabat) らの EU Index [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] のナンバリングで 226 番目の Cys から C 末端、あるいは 230 番目の Pro から C 末端までを意味する。抗体の断片としては、H 鎖の単量体、H 鎖の 2 量体などがあげられる。

Fc 領域の一部を有する融合蛋白質とは、抗体の Fc 領域の一部を含んだ抗体あるいは抗体の断片と、酵素、サイトカインなどの蛋白質とを融合させた物質（以下、Fc 融合蛋白質と称す）を意味する。

本発明において、抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合糖鎖としては、コア構造の非還元末端側にガラクトース-N-アセチルグルコサミン（以下、Gal-GlcNAc と表記する）の枝を並行して 1 ないしは複数本有し、更に Gal-GlcNAc の非還元末端側にシアル酸、バイセクティングの N-アセチルグルコサミンなどの構造を有する複合型をあげることができる。

抗体分子の Fc 領域には、N-グリコシド結合糖鎖がそれぞれ 1 箇所ずつ結合する領域を有しているので、抗体 1 分子あたり 2 本の糖鎖が結合している。抗体に結合する 2 本の N-グリコシド結合糖鎖には多数の構造の糖鎖が存在することになるので、Fc 領域に結合した糖鎖構造の観点から抗体分子の同一性を判断することができる。

抗体組成物とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であり、該組成物は、単一の糖鎖構造を有する抗体分子で構成されていてもよいし、複数の異なる糖鎖構造を有する抗体分子から構成されていてもよい。

抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の修飾は、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を抗体分子の Fc 領域に結合させることが好ましい。

本発明において、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖とは、フコースの 1 位が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に  $\alpha$  結合していない糖鎖をいう。

該糖鎖は、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の修飾に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞により合成される。

本発明において、フコースの 1 位が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に  $\alpha$  結合していない糖鎖の修飾に関与する酵素蛋白質としては、

- (a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素蛋白質（以下、「GDP-フコース合成酵素」と表記する）；
- (b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素蛋白質（以下、「 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素」と表記する）；
- (c) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質（以下、「GDP-フコース輸送蛋白質」と表記する）などがあげられる。

本発明において、GDP-フコース合成酵素とは、細胞内で糖鎖へのフコースの供給源である糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素であればいかなる酵素も包含し、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に影響を与える酵素のことをいう。

細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースは、de novo の合成経路あるいは Salvage 合成経路により供給されている。したがって、これら合成経路に関与する酵素はすべて GDP-フコース合成酵素に包含される。

de novo の合成経路に関与する GDP-フコース合成酵素としては、具体的には、GDP-mannose 4-dehydratase (GDP-マンノース 4-デヒドラターゼ；以下、GMD と表記する)、GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase (GDP-ケートデオキシマンノース 3,5-エピメラーゼ, 4-リダクターゼ；以下、Fx と表記する) などがあげられる。

Salvage 合成経路に関与する GDP-フコース合成酵素としては、具体的には、GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase (GDP-ベータ-L-フコース-ピロホスホリラーゼ；以下、GFPP と表記する)、Fucokinase (フコキナーゼ) などがあげられる。

細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に影響を与える酵素としては、上述の細胞内の糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成経路に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

GMD としては、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質、以下の (c)、(d) および (e) からなる群から選ばれる蛋白質などがあげられる。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA；

(c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(d) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

Fx としては、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質、以下の (c)、(d) および (e) からなる群から選ばれる蛋白質などがあげられる。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA；

(c) 配列番号 19 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(d) 配列番号 19 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質；

(e) 配列番号 19 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

GFPP としては、以下の (a) および (b) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質、以下の (c)、(d) および (e) からなる群から選ばれる蛋白質などがあげられる。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(c) 配列番号 20 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(d) 配列番号 20 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質 ;

(e) 配列番号 20 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

本発明において、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に関与する酵素であればいかなる酵素も包含される。N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に関与する酵素とは、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に影響を与える酵素を意味する。

$\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼや  $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。

また、上述の N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する反応に関与する酵素の活性に影響を与えたり、該酵素の基質となる物質の構造に影響を与える酵素も包含される。

$\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼとしては、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質、以下の (e)、(f)、(g)、(h)、(i) および (j) からなる群から選ばれる蛋白質などがあげられる。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ  $\alpha$  1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(e) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(f) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(g) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$  1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(h) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$  1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(i) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$  1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(j) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$  1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

GDP-フコース輸送蛋白質としては、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質、または細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースをゴルジ体内へ輸送する反応に影響を与える蛋白質であればいかなる蛋白質も包含される。

GDP-フコース輸送蛋白質としては、具体的には、GDP-フコーストランスポーターなどがあげられる。

また、細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースをゴルジ体内へ輸送する反応に影響を与える蛋白質としては、上述の GDP-フコース輸送蛋白質の活性に影響を与えたり、発現に影響を与える蛋白質も包含される。

本発明の GDP-フコーストランスポーターとしては、以下の (a)～(h) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質があげられる。

(a) 配列番号 91 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 93 で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号 95 で表される塩基配列からなる DNA ;

(d) 配列番号 97 で表される塩基配列からなる DNA ;

(e) 配列番号 91 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(f) 配列番号 93 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(g) 配列番号 95 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(h) 配列番号 97 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質をコードする DNA。

さらに、本発明の GDP-フコーストランスポーターとしては、以下の (i) ~ (t) からなる群から選ばれる蛋白質があげられる。

(i) 配列番号 92 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(j) 配列番号 94 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(k) 配列番号 96 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(l) 配列番号 98 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(m) 配列番号 92 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質 ;

(n) 配列番号 94 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質 ;

(o) 配列番号 96 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質 ;

(p) 配列番号 98 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質 ;

(q) 配列番号 92 で表されるアミノ酸配列と 80 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質 ;



(r) 配列番号 94 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；

(s) 配列番号 96 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質；

(t) 配列番号 98 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質。

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA とは、例えば配列番号 1、2、48、51、65、91、93、95 または 97 で表される塩基配列を有する DNA などの DNA またはその一部の断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法を用いることにより得られる DNA を意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来の DNA を固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0mol/L の塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2 倍濃度の SSC 溶液（1 倍濃度の SSC 溶液の組成は、150mmol/L 塩化ナトリウム、15mmol/L クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できる DNA をあげることができる。ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989（以下、モレキュラー・クローニング第 2 版と略す）、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997（以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す）、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995) 等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能な DNA として具体的には、配列番号 1、2、48、51、65、91、93、95 または 97 で表される塩基配列と少なくとも 60%以上の相同性を有する DNA、好ましくは 70%以上、より好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上、特に好ましくは 95%以上、最も好ましくは 98%以上の相同性を有する DNA をあげることができる。

配列番号 19、20、23、24、71、92、94、96 または 98 で表されるアミノ酸配列において 1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD 活性、Fx 活性、GFPP 活性または GDP-フコーストランスポーター活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラ

ー・バイオロジー、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば、配列番号 1、2、48、51 または 65 で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする DNA に部位特異的変異を導入することにより取得することができる。欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は 1 個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは 1～20 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個である。

また、用いられる蛋白質が、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性、GMD 活性、Fx 活性、GFPP 活性または GDP-フコーストランスポーター活性を有するためには、それぞれ配列番号 19、20、23、24、71、92、94、96 または 98 で表されるアミノ酸配列と BLAST[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 215, 403 (1990)] や FASTA[メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 183, 63 (1990)]等の解析ソフトを用いて計算したときに、少なくとも 80%以上、好ましくは 85%以上、より好ましくは 90%以上、さらに好ましくは 95%以上、特に好ましくは 97%以上、最も好ましくは 99%以上の相同性を有する。

上述の細胞を取得する方法としては、目的とする酵素活性を低下または欠失させることができる手法であれば、いずれの手法でも用いることができる。上述の酵素活性を低下または欠失させる手法としては、

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
- (b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
- (c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
- (d) 酵素の遺伝子の転写または翻訳を抑制する手法；などがあげられる。

また、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が $\alpha$ 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を選択する方法もあげられる。

レクチン耐性を有する細胞は、細胞培養時に一定の有効濃度のレクチンが存在しても、生育が阻害されない。

本発明において、生育が阻害されないレクチンの有効濃度は、細胞株に応じて適宜定めればよいが、通常  $10 \mu\text{g/ml}$ ~ $10.0\text{mg/ml}$ 、好ましくは  $0.5$ ~ $2.0\text{mg/ml}$  である。親株細胞に変異を導入した場合のレクチンの有効濃度とは、親株細胞が正常に生育できない濃度以上であり、好ましくは親株細胞が正常に生育できない濃度と同濃度、より好ましくは  $2$ ~ $5$  倍、さらに好ましくは  $10$  倍、最も好ましくは  $20$  倍以上である。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンとしては、該糖鎖構造を認識できるレクチンであれば、いずれのレクチンでも用いることができる。その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin)、エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒヨロチャワнтаケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) 等をあげることができる。

親株細胞とは、何らかの処理を施す前の細胞、すなわち本発明で用いるレクチンに耐性を有する細胞を選択する工程を行う前の細胞、上述した酵素活性を低下または欠失するために遺伝子工学的な処理を行う前の細胞をいう。

親株細胞としては、特に限定はないが、具体例としては、以下の細胞があげられる。

NS0 細胞の親株細胞としては、バイオ/テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 10, 169 (1992)、バイオテクノロジー・バイオエンジニアリング (Biotechnol. Bioeng.), 73, 261 (2001) 等の文献に記載されている NS0 細胞があげられる。また、理化学研究所細胞開発銀行に登録されている NS0 細胞株 (RCB0213)、あるいはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株などもあげられる。

SP2/0-Ag14 細胞の親株細胞としては、ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 126, 317, (1981)、ネイチャー (Nature), 276, 269, (1978)、ヒューマン・アンチボディーズ・アンド・ハイブリドーマズ (Human Antibodies and Hybridomas), 3, 129, (1992) 等の文献に記載されている SP2/0-Ag14 細胞があげられる。また、ATCC に登録されている SP2/0-Ag14 細胞 (ATCC CRL-1581) あるいはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株 (ATCC CRL-1581.1) などもあげられる。

チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞の親株細胞としては、Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60,

1275 (1968)、Genetics, 55, 513 (1968)、Chromosoma, 41, 129 (1973)、Methods in Cell Science, 18, 115 (1996)、Radiation Research, 148, 260 (1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)、Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 1275 (1968)、Cell, 6, 121 (1975)、Molecular Cell Genetics, Appendix I, II (p. 883-900)等の文献に記載されている CHO 細胞などがあげられる。また、ATCC に登録されている CHO-K1 株 (ATCC CCL-61)、DUXB11 株 (ATCC CRL-9096)、Pro-5 株 (ATCC CRL-1781) や、市販の CHO-S 株 (Lifetechnologies 社 Cat#11619)、あるいはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株などもあげられる。

ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞の親株細胞としては、Y3/Ag1.2.3 細胞 (ATCC CRL-1631) から樹立された株化細胞が包含される。その具体的な例としては、J. Cell. Biol. 93, 576 (1982)、Methods Enzymol. 73B, 1 (1981)等の文献に記載されている YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞があげられる。また、ATCC に登録されている YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC CRL-1662) あらういはこれら株を生育可能な培地に馴化させた亜株などもあげられる。

本発明において、Fc $\gamma$ R とは、IgG クラスの抗体に対する Fc 受容体 (以下、FcR ととも表記する) をいう。FcR とは、抗体の Fc 領域に結合する受容体を意味する [アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 9, 457 (1991)]。Fc $\gamma$ R には、Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII、Fc $\gamma$ RIII サブクラスおよびそれらの対立遺伝子変異体およびオルターナティブスプライシングによって生じるアイソフォームも包含される。さらに、Fc $\gamma$ RII は、Fc $\gamma$ RIIa および Fc $\gamma$ RIIb を、Fc $\gamma$ RIII は、Fc $\gamma$ RIIIa および Fc $\gamma$ RIIIb を包含する [アニュアル・レビュー・オブ・イムノロジー (Annu. Rev. Immunol.), 9, 457 (1991)]。

Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が、好ましくは 20%以上、より好ましくは 30%以上、さらに好ましくは 40%以上、特に好ましくは 50%以上、最も好ましくは 100%となるように糖鎖を抗体分子の Fc 領域に結合させることにより Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を高めることができる。

Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合とは、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全ての N-グリコシド結合複合型糖鎖の合計数に対して、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖

の数が占める割合をいう。また、糖鎖の割合は、好ましくは、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合をいう。

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖とは、フコースが、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンに  $\alpha$  結合していない糖鎖をいう。好ましくは、フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖の N-アセチルグルコサミンの 6 位に  $\alpha$  結合していない糖鎖があげられる。

N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物中に含まれる、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合は、抗体分子からヒドラジン分解や酵素消化などの公知の方法 [生物化学実験法 23—糖タンパク質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989)] を用い、糖鎖を遊離させ、遊離させた糖鎖を蛍光標識または同位元素標識し、標識した糖鎖をクロマトグラフィー法にて分離することによって決定することができる。また、遊離させた糖鎖を HPAED-PAD 法 [ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (J. Liq. Chromatogr.), 6, 1577 (1983)] によって分析することによっても決定することができる。本発明の方法により、Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性が高められた抗体組成物は、高い ADCC 活性を有する。

本発明において、ADCC 活性とは、生体内で、腫瘍細胞等の細胞表面抗原などに結合した抗体が、抗体 Fc 領域とエフェクター細胞表面上に存在する FcR との結合を介してエフェクター細胞を活性化し、腫瘍細胞等を障害する活性をいう [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., Chapter 2.1 (1995)]。エフェクター細胞としては、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージ等があげられる。

以下、本発明の方法に用いられる、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関する蛋白質の活性が低下または欠失した宿主細胞の製造方法について詳細に説明する。

#### 1. 本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、以下に述べる手法により作製することができる。

### (1) 酵素の遺伝子を標的とした遺伝子破壊の手法

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、遺伝子破壊の方法を用いることにより作製することができる。GDP-フコース合成酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinase などがあげられる。 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。GDP-フコース輸送蛋白質としては、具体的には、GDP-フコーストランスポーターなどがあげられる。

ここでいう遺伝子とは、DNA または RNA を含む。

遺伝子破壊の方法としては、標的とする酵素の遺伝子を破壊することができる方法であればいかなる方法も包含される。その例としては、アンチセンス法、リボザイム法、相同組換え法、RNA-DNA oligonucleotide (RDO) 法、RNA interference (RNAi) 法、レトロウイルスを用いた方法、トランスポゾンを用いた方法等があげられる。以下これらを具体的に説明する。

#### (a) アンチセンス法またはリボザイム法による本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質遺伝子を標的とし、細胞工学, 12, 239 (1993)、バイオ／テクノロジー (BIO/TECHNOLOGY), 17, 1097 (1999)、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス (Hum. Mol. Genet.), 5, 1083 (1995)、細胞工学, 13, 255 (1994)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 96, 1886 (1999)等に記載されたアンチセンス法またはリボザイム法を用いて、例えば、以下のように作製することができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする cDNA あるいはゲノム DNA を調製する。

調製したあるいはゲノム DNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする DNA 部分、非翻訳領域の部分あ

るいはイントロン部分を含む適当な長さのアンチセンス遺伝子またはリボザイムのコンストラクトを設計する。

該アンチセンス遺伝子、またはリボザイムを細胞内で発現させるために、調製した DNA の断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の方法に用いられる宿主細胞を得ることができる。また、細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造または産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択することにより、本発明の方法に用いられる宿主細胞を得ることもできる。

本発明の方法に用いられる宿主細胞を作製するために用いられる宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など、標的とする GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3 項に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計したアンチセンス遺伝子、またはリボザイムを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の 3 項に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入方法としては、後述の 3 項に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、文献 [新生化学実験講座 3—糖質 I, 糖タンパク質 (東京化学同人) 日本生化学会編 (1988)]、文献 [細胞工学, 別冊, 実験プロトコルシリーズ, グライコバイオロジー実験プロトコル, 糖タンパク質・糖脂質・プロテオグリカン (秀潤社) 谷口直之・鈴木明美・古川清・菅原一幸監修 (1996)]、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された生化学的な方法あるいは遺伝子工学的な方法などがあげられる。生化学的な方法としては、例えば、酵素特異的な基質を用いて酵素活性を評価する方法があげられる。遺伝子工

学的な方法としては、例えば、酵素遺伝子の mRNA 量を測定するノーザン解析や RT-PCR 法等があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 1 の (5) 項に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 6 項または後述の 7 項に記載の方法があげられる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする cDNA を調製する方法としては、以下に記載の方法があげられる。

### DNA の調製方法

ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から全 RNA または mRNA を調製する。

ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞の mRNA は市販のもの（例えば Clontech 社製）を用いても良いし、以下の如くヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から調製しても良い。ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)]などがあげられる。

また、全 RNA から poly (A)<sup>+</sup> RNA として mRNA を調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) 等があげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) などのキットを用いることにより mRNA を調製することができる。

調製したヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞全 RNA または mRNA から cDNA ライブラリーを作製する。

cDNA ライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えば SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies 社製)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE 社製) を用いる方法などがあげられる。



cDNA ライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE 社、ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (STRATAGENE 社製)、 $\lambda$  gt10、 $\lambda$  gt11 [ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ (DNA cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、 $\lambda$  TriplEx (Clontech 社製)、 $\lambda$  ExCell (Pharmacia 社製)、pT7T318U (Pharmacia 社製)、pcD2 [モレキュラー・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)]および pUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)]等をあげることができる。

cDNA ライブラリーを作製するための宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [STRATAGENE 社、ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [ジェネティクス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)]および Escherichia coli JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)]等が用いられる。

この cDNA ライブラリーを、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長 cDNA の割合を下げ、なるべく完全長 cDNA を効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [ジーン (Gene), 138, 171 (1994); ジーン (Gene), 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNA クローニング (羊土社) (1996); 遺伝子ライブラリーの作製法 (羊土社) (1994)]を用いて調製した cDNA ライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のアミノ酸配列に基づいて、該アミノ酸配列をコードすることが予測される塩基配列の 5' 端および 3' 端の塩基配列に特異的なデジェネレイティブプライマーを作製し、作製した cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法 [ピーシーアール・プロトコールズ (PCR Protocols), Academic Press (1990)]を用いて DNA の増幅を

行うことにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子断片を取得することができる。

取得した遺伝子断片が GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする DNA であることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM 377DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

該遺伝子断片を DNA をプローブとして、ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリー対してコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーション (モレキュラー・クローニング第 2 版) を行うことにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の DNA を取得することができる。

また、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子断片を取得するために用いたプライマーを用い、ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞に含まれる mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法を用いてスクリーニングを行うことにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の DNA を取得することもできる。

取得した GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする DNA の塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM 377DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定する。

決定した cDNA の塩基配列をもとに、BLAST 等の相同性検索プログラムを用いて、Genbank、EMBL および DDBJ などの塩基配列データベースを検索することにより、データベース中の遺伝子の中で GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードしている遺伝子を決定することもできる。

上記の方法で得られる GDP-フコース合成酵素をコードする遺伝子の塩基配列と

しては、例えば、配列番号 48、51 または 65 に記載の塩基配列があげられる。 $\alpha$  1,6-フコース修飾酵素をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 1 または 2 に記載の塩基配列があげられる。GDP-フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 91、93、95 または 97 に記載の塩基配列があげられる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社の DNA 合成機 Model 392 等の DNA 合成機で化学合成することにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の cDNA を取得することもできる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA は、例えば、モレキュラー・クローニング第 2 版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノム DNA ライブラリースクリーニングシステム (Genome Systems 社製) や Universal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH 社製) などを用いることにより、調製することができる。

上記の方法で得られる GDP-フコース合成酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 67 または 70 に記載の塩基配列があげられる。 $\alpha$  1,6-フコース修飾酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 3 に記載の塩基配列があげられる。GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 99 または 100 に記載の塩基配列があげられる。

また、発現ベクターを用いず、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の塩基配列に基づいて設計したアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを、直接宿主細胞に導入することで、本発明の方法に用いられる宿主細胞を得ることもできる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムは、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。具体的には、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする cDNA およびゲノム DNA の塩基配列のうち、連続した 5~150 塩基、好ましくは 5~60 塩基、より好ましくは 5~40 塩基に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドの配列情報に基づき、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列に相当するオリゴヌクレオチド (アンチセンスオリゴヌクレオチド) または該オリゴヌクレオチドの配列を含むリボザイムを合成することで調製することができる。

オリゴヌクレオチドとしては、オリゴ RNA および該オリゴヌクレオチドの誘導体（以下、オリゴヌクレオチド誘導体という）等があげられる。

オリゴヌクレオチド誘導体としては、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合がホスフォロチオエート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリン酸ジエステル結合が N3'-P5' ホスフォアミデート結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースとリン酸ジエステル結合がペプチド核酸結合に変換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 プロピニルウラシルで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のウラシルが C-5 チアゾールウラシルで置換された誘導体オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド中のシトシンが C-5 プロピニルシトシンで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のシトシンがフェノキサジン修飾シトシン（phenoxazine-modified cytosine）で置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-O-プロピルリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体、あるいはオリゴヌクレオチド中のリボースが 2'-メトキシエトキシリボースで置換されたオリゴヌクレオチド誘導体等があげられる [細胞工学, 16, 1463 (1997)]。

(b) 相同組換え法による本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、染色体上の標的遺伝子を相同組換え法を用い改変することによって作製することができる。

染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)（以下、「マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す）、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES 細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995)（以下、「ES 細胞を用いた変異マウスの作製」と略す）等に記載の方法を用い、例えば以下のように行うことができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA を調製する。

ゲノム DNA の塩基配列にも基づき、改変する標的遺伝子（例えば、GDP-フコー

ス合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の構造遺伝子、あるいはプロモーター遺伝子) を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。

作製したターゲットベクターを宿主細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、本発明の方法に用いられる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3 項に記載の宿主細胞があげられる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA を調製する方法としては、上記 1 の (1) 項の (a) に記載のゲノム DNA の調製方法などがあげられる。

上記の方法で得られる GDP-フコース合成酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 67 または 70 に記載の塩基配列があげられる。 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 3 に記載の塩基配列があげられる。GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA の塩基配列として、例えば配列番号 99 または 100 に記載の塩基配列があげられる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、ES 細胞を用いた変異マウスの作製等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサクション型いずれでも用いることができる。

各種宿主細胞へのターゲットベクターの導入には、後述の 3 項に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、ES 細胞を用いた変異マウスの作製等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリ A 選択などの方法を用いることができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノム DNA に対するザンハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) や PCR 法 [ピーシーアール・プロトコールズ (PCR Protocols), Academic Press (1990)]

等があげられる。

(c) RDO 方法による本発明の細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、RDO 法を用い、例えば、以下のように作製することができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の cDNA あるいはゲノム DNA を調製する。

調製した cDNA あるいはゲノム DNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする部分、非翻訳領域の部分あるいはイントロン部分を含む適当な長さの RDO のコンストラクトを設計し合成する。

合成した RDO を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、すなわち GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質に変異が生じた形質転換体を選択することにより、本発明の方法に用いられる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3 項に記載の宿主細胞があげられる。

各種宿主細胞への RDO の導入には、後述の 3 項に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の cDNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) 項の (a) に記載の DNA の調製方法などがあげられる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のゲノム DNA を調製する方法としては、例えば、上記 1 の (1) 項の (a) に記載のゲノム DNA の調製方法などがあげられる。

DNA の塩基配列は、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えば、サンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.

U. S. A.), 74, 5463 (1977)]あるいは ABI PRISM 377DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定する。

RD0 は、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。

RD0 を宿主細胞に導入し、標的とした酵素、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子に変異が生じた形質転換体を選択する方法としては、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された染色体上の遺伝子の変異を直接検出する方法があげられる。

また、前記 1 の (1) 項の (a) に記載の、導入した GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法、後述の 1 の (5) 項に記載の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法、あるいは、後述の 6 項または後述の 7 項に記載の産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法も用いることができる。

RD0 のコンストラクトは、サイエンス (Science), 273, 1386 (1996); ネイチャー・メディシン (Nature Medicine), 4, 285 (1998); ヘパトロロジー (Hepatology), 25, 1462 (1997); ジーン・セラピー (Gene Therapy), 5, 1960 (1999); ジャーナル・オブ・モレキュラー・メディシン (J. Mol. Med.), 75, 829 (1997); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8774 (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 8768 (1999); ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nuc. Acids. Res.), 27, 1323 (1999); インベスティゲーション・オブ・ダーマトロジー (Invest. Dermatol.), 111, 1172 (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotech.), 16, 1343 (1998); ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotech.), 18, 43 (2000); ネイチャー・バイオテクノロジー (Nature Biotech.), 18, 555 (2000)等の記載に従って設計することができる。

(d) RNAi 方法による本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、RNAi 法を用い、

例えば、以下のように作製することができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の cDNA を調製する。

調製した cDNA の塩基配列を決定する。

決定した DNA の配列に基づき、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする部分あるいは非翻訳領域の部分を含む適当な長さの RNAi 遺伝子のコンストラクトを設計する。

該 RNAi 遺伝子を細胞内で発現させるために、調製した DNA の断片、または全長を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより形質転換体を得る。

導入した GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性、あるいは産生抗体分子または細胞表面上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の方法に用いられる宿主細胞を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3 項に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、設計した RNAi 遺伝子を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の 3 項に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の 3 項に記載の各種宿主細胞に適した組換えベクターの導入方法を用いることができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記 1 の (1) 項の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 1 の (5) 項に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 6 項また



は後述の 7 項に記載の方法があげられる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の cDNA を調製する方法としては、例えば、前記 1 の (1) 項の (a) に記載された DNA の調製方法などがあげられる。

また、発現ベクターを用いず、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の塩基配列に基づいて設計した RNAi 遺伝子を、直接宿主細胞に導入することで、本発明の方法に用いられる宿主細胞を得ることもできる。

RNAi 遺伝子は、常法または DNA 合成機を用いることにより調製することができる。

RNAi 遺伝子のコンストラクトは、[ネイチャー (Nature), 391, 806 (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 15502 (1998); ネイチャー (Nature), 395, 854 (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 5049 (1999); セル (Cell), 95, 1017 (1998); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 96, 1451 (1999); プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 95, 13959 (1998); ネイチャー・セル・バイオロジー (Nature Cell Biol.), 2, 70 (2000)] 等の記載に従って設計することができる。

(e) トランスポゾンを用いた方法による、本発明の方法に用いられる宿主細胞の作製

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、ネイチャー・ジェネティク (Nature Genet.), 25, 35 (2000)等に記載のトランスポゾンのシステムを用い、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に突然変異体を選択することで、本発明の方法に用いられる宿主細胞を作製することができる。

トランスポゾンのシステムとは、外来遺伝子をランダムに染色体上に挿入させることで突然変異を誘発させるシステムであり、通常、トランスポゾンに挿入された外来遺伝子を突然変異を誘発させるベクターとして用い、この遺伝子を染色体上にランダムに挿入させるためのトランスポゼースの発現ベクターを同時に細胞

の中に導入する。

トランスポゼースは、用いるトランスポゾンに配列に適したものであればいかなるものも用いることができる。

外来遺伝子としては、宿主細胞の DNA に変異を誘起するものであればいかなる遺伝子も用いることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3 項に記載の宿主細胞があげられる。各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の 3 項に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、前記 1 の (1) 項の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の 1 の (5) 項に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として突然変異体を選択する方法としては、例えば、後述の 6 項または後述の 7 項に記載の方法があげられる。

## (2) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、該酵素のドミナントネガティブ体を導入する手法を用いることにより作製することができる。GDP-フコース合成酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinase などがあげられる。 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。GDP-フコース輸送蛋白質としては、具体的には、GDP-フコーストランスポーターなどがあげられる。

これらの酵素は、基質特異性を有したある特定の反応を触媒する酵素であり、このような基質特異性を有した触媒作用を有する酵素の活性中心を破壊することで、これらの酵素のドミナントネガティブ体を作製することができる。標的とする酵素のうち、GMD を例として、そのドミナントネガティブ体に作製について具体的に以下に述べる。

大腸菌由来の GMD の立体構造を解析した結果、4 つのアミノ酸（133 番目のトレオニン、135 番目のグルタミン酸、157 番目のチロシン、161 番目のリジン）が酵素活性に重要な機能を担っていることが明らかにされている [ストラクチャー (Structure), 8, 2 (2000)]。すなわち、立体構造の情報にもとづきこれら 4 つのアミノ酸を異なる他のアミノ酸に置換した変異体を作製した結果、いずれの変異体においても有意に酵素活性が低下していたことが示されている。一方、GMD の補酵素 NADP や基質である GDP-マンノースとの結合能に関しては、いずれの変異体においてもほとんど変化が観察されていない。従って、GMD の酵素活性を担うこれら 4 つのアミノ酸を置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。大腸菌由来の GMD の結果に基づき、アミノ酸配列情報をもとにした相同性比較や立体構造予測を行うことにより、例えば、CHO 細胞由来の GMD（配列番号 65）では、155 番目のトレオニン、157 番目のグルタミン酸、179 番目のチロシン、183 番目のリジンを他のアミノ酸に置換することによりドミナントネガティブ体を作製することができる。このようなアミノ酸置換を導入した遺伝子の作製は、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された部位特異的変異導入法を用いて行うことができる。

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、上述のように作製した標的酵素のドミナントネガティブ体遺伝子を用い、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版等に記載された遺伝子導入の方法に従って、例えば、以下のように作製することができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質のドミナントネガティブ体をコードする遺伝子（以下、ドミナントネガティブ体遺伝子と略記する）を調製する。

調製したドミナントネガティブ体遺伝子の全長 DNA をもとにして、必要に応じて、該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長 DNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、形質転換体を得る。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$  1, 6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質

白質の活性、あるいは産生抗体分子または細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標に形質転換体を選択することで、本発明の方法に用いられる宿主細胞を作製することができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、標的とする GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を有しているものであればいずれも用いることができる。具体的には、後述の 3 項に記載の宿主細胞があげられる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組み込みが可能で、目的とするドミナントネガティブ体をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。具体的には、後述の 3 項に記載の発現ベクターがあげられる。

各種宿主細胞への遺伝子の導入には、後述の 3 項に記載の各種宿主細胞に適した組み換えベクターの導入方法を用いることができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、前記 1 の (1) 項の (a) に記載の方法があげられる。

細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 1 の (5) 項に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を指標として形質転換体を選択する方法としては、例えば、後述の 6 項または後述の 7 項に記載の方法があげられる。

### (3) 酵素に突然変異を導入する手法

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子について突然変異を導入し、該酵素に突然変異を生じた所望の細胞株を選択する手法を用いることにより作製できる。

GDP-フコース合成酵素としては、GMD、Fx、GFPP、Fucokinase などがあげられる。 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。GDP-フコース輸送蛋白質としては、具体的には、GDP-フコーストランスポーターなどがあげられる。

酵素に突然変異を導入する方法としては、1) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、GDP-フコース合成酵

素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を指標として所望の細胞株を選択する方法、2) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、生産抗体分子の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法、3) 突然変異誘発処理で親株を処理した突然変異体あるいは自然発生的に生じた突然変異体から、該細胞の細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を指標として所望の細胞株を選択する方法などがあげられる。

突然変異誘発処理としては、親株の細胞の DNA に点突然変異、欠失あるいはフレームシフト突然変異を誘起するものであればいかなる処理も用いることができる。

具体的には、エチルニトロソウレア、ニトロソグアニジン、ベンゾピレン、アクリジン色素による処理、放射線の照射などがあげられる。また、種々のアルキル化剤や発癌物質も突然変異誘発物質として用いることができる。突然変異誘発物質を細胞に作用させる方法としては、例えば、組織培養の技術 第3版（朝倉書店）日本組織培養学会編（1996）、ネイチャー・ジェネティクス (Nature Genet.), 24, 314 (2000) 等に記載の方法をあげることができる。

自然発生的に生じた突然変異体としては、特別な突然変異誘発処理を施さないで、通常の細胞培養の条件で継代培養を続けることによって自然発生的に生じる突然変異体をあげることができる。

GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性を測定する方法としては、例えば、前記 1 の (1) 項の (a) に記載の方法があげられる。産生抗体分子の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の 6 項または後述の 7 項に記載の方法があげられる。細胞膜上の糖蛋白質の糖鎖構造を識別する方法としては、例えば、後述の 1 の (5) 項に記載の方法があげられる。

#### (4) 酵素の遺伝子の転写または翻訳を抑制する手法

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の遺伝子を標的とし、アンチセンス RNA/DNA 技術 [バイオサイエンスとインダストリー, 50, 322 (1992)、化学, 46, 681 (1991)、Biotechnology, 9, 358 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 87 (1992)、Trends in Biotechnology, 10, 152 (1992)、細胞工学, 16, 1463 (1997)]、トリプル・ヘリックス技術 [Trends in Biotechnology, 10, 132

(1992)]等を用い、標的とする遺伝子の転写または翻訳を抑制することで作製することができる。

GDP-フコース合成酵素としては、具体的には、GMD、Fx、GFPP、Fucokinase などがあげられる。 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素としては、具体的には、 $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ、 $\alpha$ -L-フコシダーゼなどがあげられる。GDP-フコース輸送蛋白質としては、具体的には、GDP-フコーストランスポーターなどがあげられる。

(5) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法

本発明の方法に用いられる宿主細胞は、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法を用いることにより作製することができる。

N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法としては、例えば、ソマティック・セル・アンド・モレキュラー・ジェネティクス (Somatic Cell Mol. Genet.), 12, 51 (1986) 等に記載のレクチンを用いた方法があげられる。

レクチンとしては、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンであればいずれのレクチンでも用いることができるが、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin) エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒイロチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) 等をあげることができる。

具体的には、 $1\mu\text{g/mL}$ ~ $1\text{mg/mL}$  の濃度の上述のレクチンを含む培地で 1 日~2 週間、好ましくは 1 日~1 週間培養し、生存している細胞を継代培養あるいはコロニーをピックアップし別の培養器に移し、さらに引き続きレクチンを含む培地で培養を続けることによって、本発明の N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択することができる。

レクチン耐性細胞であることを確認する方法としては、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素または GDP-フコース輸送蛋白質の発現を確認する方法、

直接レクチンを加えた培地に細胞を培養する方法などがあげられる。具体的には細胞内の $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素の一つである $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼの mRNA の発現量を測定し、mRNA の発現が低下していればレクチン耐性の細胞であるといえる。

## 2. トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫の作製

本発明の方法に用いられる細胞は、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素蛋白質および GDP-フコース輸送蛋白質からなる群から選ばれる蛋白質の少なくとも 1 つ以上の蛋白質の活性が低下または欠失するようにゲノム遺伝子が改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫を用いて、製造することができる。トランスジェニック非ヒト動物あるいは植物またはそれら子孫は、上述の蛋白質の遺伝子を標的として、1. に記載の手法と同様の手法を用いて作製することができる。

トランスジェニック非ヒト動物の場合、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の胚性幹細胞に、前記 1 項に記載の手法と同様の手法を用いることにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失された本発明の方法に用いられる胚性幹細胞を作製することができる。

具体的は、染色体上の GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素または GDP-フコース輸送蛋白質をコードする遺伝子を公知の相同組換えの手法 [例えば、Nature, 326, 6110 (1987)、Cell, 51, 503 (1987) 等] により不活化または任意の配列と置換した変異クローンを作製する。作製した該変異クローンを用い、動物の受精卵の胚盤胞 (Blastocyst) への注入キメラ法または集合キメラ法等の手法により、胚性幹細胞クローンと正常細胞からなるキメラ個体を調製することができる。このキメラ個体と正常個体の掛け合わせにより、全身の細胞で GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失されたトランスジェニック非ヒト動物を得ることができる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、ES 細胞を用いた変異マウスの作製等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサクション型、ジーントラッ

ブ型いずれでも用いることができる。

胚性幹細胞へのターゲットベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 (マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版)、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (日本特許第 2606856、日本特許第 2517813)、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ 4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編(1994)]、ウイルスベクター法 (マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版) 等をあげることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)、E S 細胞を用いた変異マウスの作製等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリ A 選択などの方法を用いることができる。具体的には、hprt 遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、hprt 遺伝子を欠損した胚性幹細胞に導入後、胚性幹細胞をアミノプテリン、ヒポキサンチンおよびチミジンを含む培地で培養し、アミノプテリン耐性の株を選別することにより、hprt 遺伝子を含む相同組換え体を選別するポジティブ選択を行なうことができる。ネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ベクターを導入した胚性幹細胞を G418 を含む培地で培養し、G418 耐性の株を選別することにより、ネオマイシン耐性遺伝子を含む相同組換え体を選別するポジティブ選択を行なうことができる。DT 遺伝子を含むターゲットベクターの場合は、ベクターを導入した胚性幹細胞を培養し、生育してきた株を選別する (相同組換え以外のランダムに染色体に挿入された組換え体は、DT 遺伝子が染色体に組み込まれて発現するため、DT の毒性により生育できない) ことにより、DT 遺伝子を含まない相同組換え体を選別するネガティブ選択を行なうことができる。選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノム DNA に対するサザンハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) や PCR 法 [ピーシーアール・プロトコールズ (PCR Protocols), Academic Press (1990)] 等があげられる。

胚性幹細胞を集合キメラ法を用いて受精卵に取り込ませる場合には、一般に 8



細胞期以前の発生段階の受精卵を用いることが好ましい。胚性幹細胞を注入キメラ法を用いて受精卵に取り込ませる場合には、一般に 8 細胞期から胚盤胞の発生段階の受精卵を用いることが好ましい。

雌マウスへ受精卵を移植する場合には、精管結紮雄非ヒト哺乳動物と交配させることにより、受精能を誘起された偽妊娠雌マウスに得られた受精卵を人工的に移植および着床させる方法が好ましく、偽妊娠雌マウスは自然交配によっても得られるが、黄体形成ホルモン放出ホルモン（以下、LHRH と略する）あるいはその類縁体を投与後、雄マウスと交配させることにより、受精能を誘起された偽妊娠雌マウスを得ることもできる。LHRH の類縁体としては、例えば [3, 5-Dil-Tyr5]-LHRH、[Gln8]-LHRH、[D-Ala6]-LHRH、des-Gly10-[D-His(Bzl)6]-LHRH ethylamide 等があげられる。

また、目的とする非ヒト動物、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル、ウサギ等の受精卵細胞に、前記 1 項に記載の手法と同様の手法を用いることにより、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失された本発明の受精卵細胞を作製することができる。

作製した受精卵細胞を、マニピュレーティング・マウス・エンブリオ第 2 版等に記載の胚移植の方法を用いて偽妊娠雌の卵管あるいは子宮に移植し出産させることで、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失したトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。

トランスジェニック植物の場合、目的とする植物体カルスまたは細胞に、前記 1 項に記載の手法と同様の手法を用いることにより、GDP-フコース合成酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位あるいは 3 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した本発明のカルスを作製することができる。

作製したカルスを、公知の方法〔組織培養，20 (1994)；組織培養，21 (1995)；トレンド・イン・バイオテクノロジー (Trends in Biotechnology)，15，45 (1997)〕に準じてオーキシンおよびサイトカニンを含む培地で培養することで再分化させ、GDP-フコース合成酵素、 $\alpha$ 1,6-フコース修飾酵素、または GDP-フコース輸送蛋白質の活性が低下または欠失したトランスジェニック植物を作製することができる。

### 3. 抗体組成物の製造方法

抗体組成物は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988（以下、アンチボディズと略す）、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press, 1996（以下、モノクローナル・アンチボディズと略す）、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996（以下、アンチボディエンジニアリングと略す）等に記載された方法を用い、例えば、以下のように宿主細胞中で発現させて取得することができる。

抗体分子の全長 cDNA を調製し、該抗体分子をコードする部分を含む適当な長さの DNA 断片を調製する。

該 DNA 断片、または全長 cDNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、抗体分子を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合糖鎖の修飾に係わる酵素を、遺伝子工学的な手法を用いて導入した、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等の細胞を宿主細胞として用いることもできる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、目的とする抗体分子をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

cDNA は、上記1の(1)項の(a)に記載のDNAの調製方法に従い、ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞より、目的とする抗体分子に特異的なプローブプライマー等を用いて調製することができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを  
用いてもよく、例えば、ヘキサースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、  
PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、  
gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、  
MF $\alpha$ 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロ  
ミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する酵母、例えば、  
Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、  
Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいず  
れも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [メソズ・エンザ  
イモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [プ  
ロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc.  
Natl. Acad. Sci. U.S.A), 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オ  
ブ・バクテリオロジー (J. Bacteriology), 153, 163 (1983)]、プロシーディン  
グス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.  
U.S.A), 75, 1929 (1978)]に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNAI、  
pcDM8 (フナコシ社製)、pAGE107 [特開平 3-22979 ; サイトテクノロジー  
(Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (特開平 2-227075)、pCDM8 [ネイチ  
ャー (Nature), 329, 840 (1987)]、pcDNAI/Amp (Invitrogen 社製)、pREP4  
(Invitrogen 社製)、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J.  
Biochemistry), 101, 1307 (1987)]、pAGE210 等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いる  
ことができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の IE (immediate early) 遺  
伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、  
メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモータ  
ー等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモ  
ーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞で  
ある COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開

昭 63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 [マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 (日本特許第 2606856、日本特許第 2517813)、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ 4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編 (1994)]、ウイルスベクター法 (マニピュレイティング・マウス・エンブリオ第 2 版) 等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47 (1988) 等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともに Invitrogen 社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーBaculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (Invitrogen 社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平 2-227075）、リポフュージョン法〔プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.）, 84, 7413（1987）〕等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）の 35S プロモーター、イネアクチン 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を用いる方法（特開昭 59-140885、特開昭 60-70080、W094/00977）、エレクトロポレーション法（特開昭 60-251887）、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（日本特許第 2606856、日本特許第 2517813）等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第 2 版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、Fc 領域と他の蛋白質との融合蛋白質発現等を行うことができる。

糖鎖の合成に関与する遺伝子を導入した細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、導入した遺伝子によって糖あるいは糖鎖が付加された抗体分子を得ることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に抗体分子を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、抗体組成物を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

酵母を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含み、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は 15～40℃がよく、培養時間は、通常 16 時間～7 日間である。培養中の pH は 3.0～9.0 に保持する。pH の調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときにはイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド等を、trp プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地 [ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [サイエンス (Science), 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地 [ヴェイロロジー (Virology), 8, 396 (1959)]、199 培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)]、Whitten 培地 [発生工学実験マニュアルトランスジ

エニック・マウスの作り方（講談社）勝木元也編（1987）] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH6.0～8.0、30～40℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下等の条件下で 1～7 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地（Pharmingen 社製）、Sf-900 II SFM 培地（Life Technologies 社製）、ExCell400、ExCell405（いずれも JRH Biosciences 社製）、Grace's Insect Medium [ネイチャー（Nature），195，788（1962）]等を用いることができる。

培養は、通常 pH6.0～7.0、25～30℃等の条件下で、1～5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ（MS）培地、ホワイト（White）培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH5.0～9.0、20～40℃の条件下で 3～60 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、抗体分子をコードする DNA を組み込んだ組換え体ベクターを保有する酵母、動物細胞、昆虫細胞あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。

抗体遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第 2 版に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

抗体組成物の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿

主細胞や、生産させる抗体分子の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

抗体組成物が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227 (1989); ジーン・デベロップメント (Genes Develop.), 4, 1288 (1990)]、または特開平 5-336963、特開平 6-823021 等に記載の方法を準用することにより、該抗体組成物を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、抗体分子をコードする DNA、および抗体分子の発現に適切なシグナルペプチドをコードする DNA を挿入し、該発現ベクターを発現させることにより、目的とする抗体分子を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平 2-227075 に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体 (トランスジェニック非ヒト動物) または植物個体 (トランスジェニック植物) を造成し、これらの個体を用いて抗体組成物を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、抗体組成物を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該抗体組成物を採取することにより、該抗体組成物を製造することができる。

動物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば公知の方法 [アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition), 63, 639S (1996); アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition), 63, 627S (1996); バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする抗体組成物を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、抗体分子をコードする DNA を導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、抗体組成物を該動物中に生成蓄積させ、該動物中より抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を製造することができる。該



動物中の生成蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭 63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである $\alpha$ カゼインプロモーター、 $\beta$ カゼインプロモーター、 $\beta$ ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて抗体組成物を製造する方法としては、例えば抗体分子をコードする DNA を導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養，20（1994）；組織培養，21（1995）；トレンド・イン・バイオテクノロジー（Trends in Biotechnology），15，45（1997）〕に準じて栽培し、抗体組成物を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該抗体組成物を採取することにより、抗体組成物を生産する方法があげられる。

抗体分子をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された抗体組成物は、例えば抗体組成物が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、DEAE-セファロース、DIAION HPA-75（三菱化学（株）製）等レジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（Pharmacia 社製）等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

また、抗体組成物が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として抗体組成物の不溶体を回収する。回収した抗体組成物の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該抗体組成物を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該抗体組成物の精製標品を得ることができる。

抗体組成物が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該抗体組成物あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等

の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、抗体組成物の精製標品を得ることができる。

このようにして取得される抗体組成物として、例えば、抗体、抗体の断片、抗体の Fc 領域の一部を有する融合蛋白質などをあげることができる。

以下に、抗体組成物の取得のより具体的な例として、ヒト化抗体の組成物および Fc 融合蛋白質の製造方法について記すが、他の抗体組成物を当該方法と同様にして取得することもできる。

#### A. ヒト化抗体組成物の製造

##### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとは、ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の C 領域としては、任意のヒト抗体の CH および CL であることができ、例えば、ヒト抗体の H 鎖の IgG1 サブクラスの C 領域（以下、hC $\gamma$ 1 と表記する）およびヒト抗体の L 鎖の  $\kappa$  クラスの C 領域（以下、hC $\kappa$  と表記する）等があげられる。

ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン (Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスの LTR [バイオケミカル・アンド・バイ

オフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)], 免疫グロブリン H 鎖のプロモーター [セル (Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル (Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖および L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ (以下、タンデム型と表記する) のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖および L 鎖の発現量のバランスが均衡する等の点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)]。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

## (2) ヒト以外の動物の抗体の V 領域をコードする cDNA の取得

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の VH および VL をコードする cDNA は以下のようにして取得することができる。

目的のマウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞より mRNA を抽出し、cDNA を合成する。合成した cDNA をファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングして cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、既存のマウス抗体の C 領域部分或いは V 領域部分をプローブとして用い、VH をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミドおよび VL をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的のマウス抗体の VH および VL の全塩基配列を決定し、塩基配列より VH および VL の全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマ細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)], また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) 等があげられる。また、ハイブリドーマ細胞から mRNA を調製するキットとしては、

Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) 等があげられる。

cDNA の合成および cDNA ライブラリー作製法としては、常法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) ; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Supplement 1-34]、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシング・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、 $\lambda$  zap II (Stratagene 社製)、 $\lambda$  gt10、 $\lambda$  gt11 [ディーエヌエー・クローニング: ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、 $\lambda$  ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia 社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] および pUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] および JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーからのヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA クローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction [以下、PCR 法と表記する; モレキュラー・ク

ローニング第 2 版；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Supplement 1-34] により VH および VL をコードする cDNA を調製することもできる。

上記方法により選択された cDNA を、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)]あるいは ABI PRISM 377DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列から VH および VL の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体の VH および VL の全アミノ酸配列 [シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト (Sequences of Proteins of Immunological Interest), US Dept. Health and Human Services (1991)、以下、シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレストと略す] と比較することにより、取得した cDNA が分泌シグナル配列を含む抗体の VH および VL の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

### (3) ヒト以外の動物の抗体の V 領域のアミノ酸配列の解析

分泌シグナル配列を含む抗体の VH および VL の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体の VH および VL の全アミノ酸配列 (シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト) と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよび N 末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。また、VH および VL の各 CDR のアミノ酸配列についても、既知の抗体の VH および VL のアミノ酸配列 (シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト) と比較することによって見出すことができる。

### (4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

前記 3 の (1) 項に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子の上流に、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を、ヒト以

外の動物の抗体 VH および VL の 3' 末端側の塩基配列とヒト抗体の CH および CL の 5' 末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成 DNA とそれぞれ連結し、それぞれを前記 3 の (1) 項に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

#### (5) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA は、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR を移植するヒト抗体の VH および VL のフレームワーク（以下、FR と表記する）のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bank 等のデータベースに登録されているヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列、ヒト抗体の VH および VL の FR の各サブグループの共通アミノ酸配列（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）等があげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも 60% 以上）を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。

次に、選択したヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を移植し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度（シーケンシズ・オブ・プロテインズ・オブ・イムノロジカル・インタレスト）を考慮して DNA 配列に変換し、ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を設計する。設計した DNA 配列に基づき、100 塩基前後の長さから成る数本の合成 DNA を合成し、それらを用いて PCR 法を行う。この場合、PCR での反応効率および合成可能な DNA の長さから、H 鎖、L 鎖とも 6 本の合成 DNA を設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、前記 3 の (1) 項で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR 後、増幅産物を pBluescript SK(-) (Stratagene

社製)等のプラスミドにクローニングし、前記3の(2)項に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列をコードする DNA 配列を有するプラスミドを取得する。

#### (6) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

前記3の(1)項に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、前記3の(5)項で構築したヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、前記3の(5)項でヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL を構築する際に用いる合成 DNA のうち、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、前記3の(1)項に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。

#### (7) ヒト化抗体の安定的生産

前記3の(4)項および(6)項に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な動物細胞に導入することによりヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体(以下、併せてヒト化抗体と表記する)を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞へのヒト化抗体発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法[特開平 2-257891; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する動物細胞としては、ヒト化抗体を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞である NS0 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、IR983F 細胞、シリアンハムスター腎臓由来である BHK 細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞である CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、前記1項に記載の本発明の方法に用いられる宿主細胞等があげられる。

ヒト化抗体発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 sulfate (以下、G418 と表

記する；SIGMA 社製）等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地（日水製薬社製）、GIT 培地（日本製薬社製）、EX-CELL302 培地（JRH 社製）、IMDM 培地（GIBCO BRL 社製）、Hybridoma-SFM 培地（GIBCO BRL 社製）、またはこれら培地に牛胎児血清（以下、FBS と表記する）等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を生産蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の生産量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法（以下、ELISA 法と表記する；アンティボディズ，Chapter 14、モノクローナル・アンティボディズ）等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、dhfr 遺伝子増幅系等を利用してヒト化抗体の生産量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる（アンティボディズ，Chapter 8、モノクローナル・アンティボディズ）。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 [以下、SDS-PAGE と表記する；ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 [アンティボディズ，Chapter 12、モノクローナル・アンティボディズ] 等で測定することができる。

## B. Fc 融合蛋白質の製造

### (1) Fc 融合蛋白質発現用ベクターの構築

Fc 融合蛋白質発現用ベクターとは、ヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子をクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の Fc 領域としては、CH2 と CH3 領域を含む領域のほか、ヒンジ領域、CH1 の一部が含まれるものも包含される。また CH2 または CH3 の少なくとも 1 つのアミノ酸が欠失、置換、付加または挿入され、実質的に Fc $\gamma$  受容体への結合活性を有するものであればいかなるものでもよい。



ヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンから成る染色体 DNA を用いることができ、また、cDNA を用いることもできる。それら遺伝子と Fc 領域を連結する方法としては、各遺伝子配列を鋳型として、PCR 法（レギュラー・クローニング第 2 版；カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー，Supplement 1-34）を行うことがあげられる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、pHSG274 [ジーン (Gene), 27, 223 (1984)]、pKCR [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 78, 1527 (1981)]、pSG1  $\beta$  d2-4 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 4, 173 (1990)] 等があげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 101, 1307 (1987)]、モロニーマウス白血病ウイルスの LTR [バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 149, 960 (1987)]、免疫グロブリン H 鎖のプロモーター [セル (Cell), 41, 479 (1985)] とエンハンサー [セル (Cell), 33, 717 (1983)] 等があげられる。

## (2) ヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする DNA の取得

ヒト抗体の Fc 領域と融合させる蛋白質とをコードする DNA は以下のようにして取得することができる。

目的の Fc と融合させる蛋白質を発現している細胞や組織より mRNA を抽出し、cDNA を合成する。合成した cDNA をファージ或いはプラスミド等のベクターにクローニングして cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、目的の蛋白質の遺伝子配列部分をプローブとして用い、目的の蛋白質をコードする cDNA を有する組換えファージ或いは組換えプラスミドを単離する。組換えファージ或いは組換えプラスミド上の目的の蛋白質の全塩基配列を決定し、塩基配列より全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等、細胞や組織を摘出することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

細胞や組織から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymol.), 154, 3 (1987)]、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) 等があげられる。また、細胞や組織から mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) 等があげられる。

cDNA の合成及び cDNA ライブラリー作製法としては、常法 (モレキュラー・クローニング第 2 版 ; カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー, Supplement 1-34)、或いは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製) や ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーの作製の際、細胞や組織から抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシックス・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、 $\lambda$  zapII (Stratagene 社製)、 $\lambda$  gt10、 $\lambda$  gt11 [ディーエヌエー・クローニング : ア・プラクティカル・アプローチ (DNA Cloning: A Practical Approach), I, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、 $\lambda$  ExCell、pT7T3 18U (Pharmacia 社製)、pcD2 [モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] 及び pUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等が用いられる。

ファージ或いはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現及び維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、C600 [ジェネティックス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] 及び JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

cDNA ライブラリーからの目的の蛋白質をコードする cDNA クローンの選択法としては、アイソトープ或いは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法或いはプラーク・ハイブリダイゼーション法（モレキュラー・クローニング第 2 版）により選択することができる。また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA 或いは cDNA ライブラリーを鋳型として、PCR 法により目的の蛋白質をコードする cDNA を調製することもできる。

目的の蛋白質をヒト抗体の Fc 領域と融合させる方法としては、PCR 法があげられる。例えば、目的の蛋白質の遺伝子配列の 5' 側と 3' 側に任意の合成オリゴ DNA (プライマー) を設定し、PCR 法を行い PCR 産物を取得する。同様に、融合させるヒト抗体の Fc 領域の遺伝子配列に対しても任意のプライマーを設定し、PCR 産物を得る。このとき、融合させる蛋白質の PCR 産物の 3' 側と Fc 領域の PCR 産物の 5' 側には同じ制限酵素部位もしくは同じ遺伝子配列が存在するようにプライマーを設定する。この連結部分周辺のアミノ酸改変が必要である場合には、その変異を導入したプライマーを用いることで変異を導入する。得られた 2 種類の PCR 断片を用いてさらに PCR を行うことで、両遺伝子を連結する。もしくは、同一の制限酵素処理をした後にライゲーションすることでも連結することができる。

上記方法により連結された遺伝子配列を、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK(-) (Stratagene 社製) 等のプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM 377DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該 DNA の塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列から Fc 融合蛋白質の全アミノ酸配列を推定し、目的のアミノ酸配列と比較することにより、取得した cDNA が分泌シグナル配列を含む Fc 融合蛋白質の完全なアミノ酸配列をコードしているかを確認することができる。

### (3) Fc 融合蛋白質の安定的生産

前記の (1) 項に記載の Fc 融合蛋白質発現ベクターを適当な動物細胞に導入することにより Fc 融合蛋白質を安定に生産する形質転換株を得ることができる。

動物細胞への Fc 融合蛋白質発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法 [特開平 2-257891; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] 等があげられる。

Fc 融合蛋白質発現ベクターを導入する動物細胞としては、Fc 融合蛋白質を生産させることができる動物細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。

具体的には、マウスミエローマ細胞である NS0 細胞、SP2/0 細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO/dhfr-細胞、CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、IR983F 細胞、シリアンハムスター腎臓由来である BHK 細胞、ヒトミエローマ細胞であるナマルバ細胞などがあげられるが、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣細胞である CHO/DG44 細胞、ラットミエローマ YB2/0 細胞、前記 1 項に記載の本発明の方法に用いられる宿主細胞等があげられる。

Fc 融合蛋白質発現ベクターの導入後、Fc 融合蛋白質を安定に生産する形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 等の薬剤を含む動物細胞培養用培地により選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (日水製薬社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302 培地 (JRH 社製)、IMDM 培地 (GIBCO BRL 社製)、Hybridoma-SFM 培地 (GIBCO BRL 社製)、またはこれら培地に牛胎児血清等の各種添加物を添加した培地等を用いることができる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に Fc 融合蛋白質を生産蓄積させることができる。培養上清中の Fc 融合蛋白質の生産量及び抗原結合活性は ELISA 法等により測定できる。また、形質転換株は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、dhfr 遺伝子増幅系等を利用して Fc 融合蛋白質の生産量を上昇させることができる。

Fc 融合蛋白質は、形質転換株の培養上清よりプロテイン A カラムやプロテイン G カラムを用いて精製することができる (アンチボディズ, Chapter 8、モノクローナル・アンティボディズ)。また、その他に通常、タンパク質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー及び限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製した Fc 融合蛋白質分子全体の分子量は、SDS-PAGE [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] やウエスタンブロッティング法 (アンチボディズ, Chapter 12、モノクローナル・アンティボディズ) 等で測定することができる。

以上、動物細胞を宿主とした抗体組成物の製造方法を示したが、上述したように、酵母、昆虫細胞、植物細胞または動物個体あるいは植物個体においても動物細胞と同様の方法により抗体組成物を製造することができる。

すでに宿主細胞が抗体分子を発現する能力を有する場合には、前記 1 項に記載した方法を用いて抗体分子を発現させる細胞を調製した後に、該細胞を培養し、該培養物から目的とする抗体組成物を精製することにより、抗体組成物を製造することができる。

#### 4. $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ に対する結合活性の測定

抗体組成物の  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  に対する結合活性は、以下に述べる手法により測定することができる。

##### (1) $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ の調製

$\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  としては、ヒトまたは非ヒト動物の末梢血リンパ球の細胞表面に存在する  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ 、 $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  をコードする遺伝子を取得し、該遺伝子を宿主細胞へ導入して細胞表面へ発現させた  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  あるいは該細胞から分泌させた  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  などを用いることができる。

以下に  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  をコードする遺伝子を取得し、該遺伝子を宿主細胞に導入して、宿主細胞上に  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  を発現させる方法および該細胞から  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  を分泌させることにより  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  を取得する方法を述べる。

ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から全 RNA または mRNA を調製する。

ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞の mRNA は市販のもの（例えば Clontech 社製）を用いても良いし、以下の如くヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から調製しても良い。ヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞から全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 [メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 154, 3 (1987)]、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry), 162, 156 (1987); 実験医学, 9, 1937 (1991)] などがあげられる。

また、全 RNA から poly (A)<sup>+</sup> RNA として mRNA を調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) 等があげられる。

さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製) などのキットを用いることにより mRNA を調製することができる。

調製したヒトまたは非ヒト動物の組織または細胞全 RNA または mRNA から cDNA ライブラリーを作製する。

cDNA ライブラリー作製法としては、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えば SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies 社製)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE 社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーを作製するためのクローニングベクターとしては、大腸菌 K12 株中で自立複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。具体的には、ZAP Express [STRATAGENE 社、ストラテジーズ (Strategies), 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (STRATAGENE 社製)、 $\lambda$  gt10、 $\lambda$  gt11 [ディーエヌエー・クローニング・ア・プラクティカル・アプローチ (DNA cloning, A Practical Approach), 1, 49 (1985)]、 $\lambda$  TriplEx (Clontech 社製)、 $\lambda$  ExCell (Pharmacia 社製)、pT7T318U (Pharmacia 社製)、pcD2 [モレキュラー・セルラー・バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 3, 280 (1983)] および pUC18 [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] 等をあげることができる。

宿主微生物としては、微生物であればいずれでも用いることができるが、好ましくは大腸菌が用いられる。具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF' [STRATAGENE 社、ストラテジーズ (Strategies), 5, 81 (1992)]、Escherichia coli C600 [ジェネティクス (Genetics), 39, 440 (1954)]、Escherichia coli Y1088 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli Y1090 [サイエンス (Science), 222, 778 (1983)]、Escherichia coli NM522 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 1 (1983)]、Escherichia coli K802 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.), 16, 118 (1966)] および Escherichia coli JM105 [ジーン (Gene), 38, 275 (1985)] 等が用いられる。

この cDNA ライブラリーを、そのまま以降の解析に用いてもよいが、不完全長 cDNA の割合を下げ、なるべく完全長 cDNA を効率よく取得するために、菅野らが開発したオリゴキャップ法 [ジーン (Gene), 138, 171 (1994); ジーン (Gene), 200, 149 (1997); 蛋白質核酸酵素, 41, 603 (1996); 実験医学, 11, 2491 (1993); cDNA クローニング (羊土社) (1996); 遺伝子ライブラリーの作製法 (羊土社) (1994)] を用いて調製した cDNA ライブラリーを以下の解析に用いてもよい。

各種 Fc $\gamma$ R IIIa の塩基配列に基づいて、5' 端および 3' 端の塩基配列に特異的なプライマーを作製し、作製した cDNA ライブラリーを鋳型として PCR 法 [ピーシーアール・プロトコールズ (PCR Protocols), Academic Press (1990)] を用いて DNA の増幅を行うことにより、Fc $\gamma$ R をコードする遺伝子を取得することができる。

取得した遺伝子が Fc $\gamma$ R IIIa をコードする DNA であることは、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー (Sanger) らのジデオキシ法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 74, 5463 (1977)] あるいは ABI PRISM 377DNA シークエンサー (PE Biosystems 社製) 等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、確認することができる。

上記の方法で得られる Fc $\gamma$ R IIIa をコードする遺伝子の塩基配列としては、例えば、配列番号 27 に記載の Fc $\gamma$ R IIIa の塩基配列があげられる。

決定された DNA の塩基配列に基づいて、フォスフォアミダイト法を利用したパーキン・エルマー社の DNA 合成機 Model 392 等の DNA 合成機で化学合成することにより、Fc $\gamma$ R IIIa をコードする遺伝子を取得することもできる。

取得した Fc $\gamma$ R IIIa をコードする cDNA を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。

該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、抗体分子を生産する形質転換体を得ることができる。

宿主細胞としては、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、目的とする Fc $\gamma$ R IIIa をコードする DNA を転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキサースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$ 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスポロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [メソズ・エンザイモロジー (Methods. Enzymol.), 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 84, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriology), 153, 163 (1983)]、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 75, 1929 (1978) に記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNA1、pcDM8 (フナコシ社製)、pAGE107 [特開平 3-22979 ; サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、pAS3-3 (特開平 2-227075)、pCDM8 [ネイチャー (Nature), 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen 社製)、pREP4 (Invitrogen 社製)、pAGE103 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochemistry), 101, 1307 (1987)]、pAGE210 等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) の IE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等をあげることができる。また、ヒト CMV の IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞、HBT5637 (特開



昭 63-299)、ラットミエローマ細胞、マウスミエローマ細胞、シリアンハムスター腎臓由来細胞、胚性幹細胞、受精卵細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 84, 7413 (1987)]、インジェクション法 [マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル]、パーティクルガン (遺伝子銃) を用いる方法 [日本特許第 2606856、日本特許第 2517813]、DEAE-デキストラン法 [バイオマニュアルシリーズ 4—遺伝子導入と発現・解析法 (羊土社) 横田崇・新井賢一編 (1994)]、ウイルスベクター法 (マニピュレイティング・マウス・エンブリオ第 2 版) 等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47 (1988) 等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともに Invitrogen 社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperda の卵巣細胞である Sf9、Sf21 [カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company, New York (1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞である High 5 (Invitrogen 社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平 2-227075）、リポフェクション法〔プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.）, 84, 7413（1987）〕等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものをを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス（CaMV）の 35S プロモーター、イネアクチン 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム（Agrobacterium）を用いる方法（特開昭 59-140885、特開昭 60-70080、W094/00977）、エレクトロポレーション法（特開昭 60-251887）、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（日本特許第 2606856、日本特許第 2517813）等をあげることができる。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第 2 版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、他の蛋白質との融合蛋白質発現等を行うことができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に Fc $\gamma$ RIIIa を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、Fc $\gamma$ RIIIa を製造することができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

酵母を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、酵母が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、酵母が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は 15～40℃がよく、培養時間は、通常 16 時間～7 日間である。培養中の pH は 3.0～9.0 に保持する。pH の調製は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lac プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、trp プロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した酵母を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地 [ザ・ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association), 199, 519 (1967)]、Eagle の MEM 培地 [サイエンス (Science), 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変 MEM 培地 [ヴェロロジー (Virology), 8, 396 (1959)]、199 培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォア・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73, 1 (1950)]、Whitten 培地 [発生工学実験マニュアルトランスジェニック・マウスの作り方 (講談社) 勝木元也編 (1987)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH6.0～8.0、30～40℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下等の条件下で 1～7 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (Pharmingen 社製)、Sf-900 II SFM 培地 (Life Technologies 社製)、ExCell400、ExCell405 (いずれも JRH Biosciences 社製)、Grace's Insect Medium [ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

培養は、通常 pH6.0~7.0、25~30℃等の条件下で、1~5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ (MS) 培地、ホワイト (White) 培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH5.0~9.0、20~40℃の条件下で 3~60 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、Fc $\gamma$ RIIIa をコードする DNA を組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、昆虫細胞あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、Fc $\gamma$ RIIIa を生成蓄積させ、該培養物より Fc $\gamma$ RIIIa を採取することにより、Fc $\gamma$ RIIIa を製造することができる。

Fc $\gamma$ RIIIa の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング 第 2 版に記載されている方法に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

Fc $\gamma$ RIIIa の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、使用する宿主細胞や、生産させる Fc $\gamma$ RIIIa の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

Fc $\gamma$ RIIIa が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナシ

ヨナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 86, 8227 (1989); ジーン・デベロップメント (Genes Develop.), 4, 1288 (1990)], または特開平 5-336963、特開平 6-823021 等に記載の方法を準用することにより、該 Fc $\gamma$ R IIIa を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、発現ベクターに、Fc $\gamma$ R IIIa をコードする DNA、および Fc $\gamma$ R IIIa の発現に適切なシグナルペプチドをコードする DNA を挿入し、該発現ベクターを発現させることにより、目的とする Fc $\gamma$ R IIIa を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平 2-227075 に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて Fc $\gamma$ R を製造することもできる。

形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、Fc $\gamma$ R IIIa を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該 Fc $\gamma$ R IIIa を採取することにより、該 Fc $\gamma$ R IIIa を製造することができる。

動物個体を用いて Fc $\gamma$ R IIIa を製造する方法としては、例えば公知の方法 [アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition), 63, 639S (1996); アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション (American Journal of Clinical Nutrition), 63, 627S (1996); バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に目的とする Fc $\gamma$ R を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、Fc $\gamma$ R IIIa をコードする DNA を導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、Fc $\gamma$ R IIIa を該動物中に生成・蓄積させ、該動物中より Fc $\gamma$ R IIIa を採取することにより、Fc $\gamma$ R IIIa を製造することができる。該動物中の生成蓄積場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭 63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で発現できるものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターである  $\alpha$  カゼインプロモーター、 $\beta$  カゼインプロモーター、 $\beta$

ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

植物個体を用いて Fc $\gamma$ RIIIa を製造する方法としては、例えば Fc $\gamma$ R をコードする DNA を導入したトランスジェニック植物を公知の方法〔組織培養、20 (1994)；組織培養、21 (1995)；トレンド・イン・バイオテクノロジー (Trends in Biotechnology), 15, 45 (1997)〕に準じて栽培し、Fc $\gamma$ RIIIa を該植物中に生成・蓄積させ、該植物中より該 Fc $\gamma$ R を採取することにより、Fc $\gamma$ RIIIa を生産する方法があげられる。

Fc $\gamma$ RIIIa をコードする遺伝子を導入した形質転換体により製造された Fc $\gamma$ RIIIa は、例えば Fc $\gamma$ RIIIa が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、DEAE-セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学 (株) 製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia 社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、Fc $\gamma$ RIIIa の精製標品を得ることができる。

また、Fc $\gamma$ RIIIa が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として Fc $\gamma$ RIIIa の不溶体を回収する。回収した Fc $\gamma$ RIIIa の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該 Fc $\gamma$ RIIIa を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法により該 Fc $\gamma$ RIIIa の精製標品を得ることができる。

Fc $\gamma$ RIIIa が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該 Fc $\gamma$ RIIIa あるいはその誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、Fc $\gamma$ RIIIa の精製標品を得ることができる。

## (2) Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性の測定

細胞膜上に発現している Fc $\gamma$ RIIIa に対する抗体組成物の結合活性は、蛍光抗体法 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)] などにより測定することができる。また、前記 4 の (1) 項に記載の方法により調製した精製 Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性は、文献 [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc., (1995); 酵素免疫測定法, 第 3 版, 医学書院 (1987); 改訂版, 酵素抗体法, 学際企画 (1985)] 等に記載のウエスタン染色、RIA (Radioimmunoassay)、VIA (Viroimmunoassay)、EIA (Enzymoimmunoassay)、FIA (Fluoroimmunoassay)、MIA (Metalloimmunoassay) などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

EIA 用のプラスチックプレートに Fc $\gamma$ RIIIa を固定化する。抗体組成物を含む試料反応させる。次に、適当な二次抗体を用いて結合した抗体組成物の量を測定する。

また、精製 Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性は、バイオセンサー [例えば、BIAcore (BIACORE 社製)] を用いた測定 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 200, 121 (1997)] や Isothermal Titration Calorimetry 法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 97, 9026 (2000)] 等によっても測定できる。

## 5. 抗体組成物の活性評価

精製した抗体組成物の蛋白量、抗原との結合活性、Fc $\gamma$ RIIIa との結合活性、エフェクター機能を測定する方法としては、モノクローナルアンチボディズ、あるいはアンチボディエンジニアリング等に記載の公知の方法を用いることができる。

その具体的な例としては、抗体組成物がヒト化抗体の場合、抗原との結合活性、抗原陽性培養細胞株に対する結合活性および Fc $\gamma$ RIIIa との結合活性は、ELISA 法および蛍光抗体法 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]、バイオセンサー [例えば、BIAcore (BIACORE 社製)] を用いた測定 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ

(J. Immunol. Methods), 200, 121 (1997)], Isothermal Titration Calorimetry 法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 97, 9026 (2000)] 等により測定できる。エフェクター機能のうち、例えば、抗原陽性培養細胞株に対する細胞障害活性は、CDC 活性、ADCC 活性等を測定することにより、評価することができる [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993)]。

## 6. 各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖の分析

各種細胞で発現させた抗体分子の糖鎖構造は、通常の糖蛋白質の糖鎖構造の解析に準じて行うことができる。例えば、IgG 分子に結合している糖鎖はガラクトース、マンノース、フコースなどの中性糖、N-アセチルグルコサミンなどのアミノ糖、シアル酸などの酸性糖から構成されており、糖組成分析および二次元糖鎖マップ法などを用いた糖鎖構造解析等の手法を用いて行うことができる。

### (1) 中性糖・アミノ糖組成分析

抗体分子の糖鎖の組成分析は、トリフルオロ酢酸等で、糖鎖の酸加水分解を行うことにより、中性糖またはアミノ糖を遊離し、その組成比を分析することができる。

具体的な方法として、Dionex 社製糖組成分析装置 (BioLC) を用いる方法があげられる。BioLC は HPAEC-PAD (high performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection) 法 [ジャーナル・オブ・リキッド・クロマトグラフィー (J. Liq. Chromatogr.), 6, 1577 (1983)] によって糖組成を分析する装置である。

また、2-アミノピリジンによる蛍光標識化法でも組成比を分析することができる。具体的には、公知の方法 [アグリカルチュラル・アンド・バイオリジカル・ケミストリー (Agruc. Biol. Chem.), 55, 283 (1991)] に従って酸加水分解した試料を 2-アミノピリジル化で蛍光ラベル化し、HPLC 分析して組成比を算出することができる。



## (2) 糖鎖構造解析

抗体分子の糖鎖の構造解析は、2次元糖鎖マップ法 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)、生物化学実験法 23-糖タンパク質糖鎖研究法 (学会出版センター) 高橋禮子編 (1989 年)] により行うことができる。2次元糖鎖マップ法は、例えば、X 軸には逆相クロマトグラフィー糖鎖の保持時間または溶出位置を、Y 軸には順相クロマトグラフィーによる糖鎖の保持時間または溶出位置を、それぞれプロットし、既知糖鎖のそれらの結果と比較することにより、糖鎖構造を推定する方法である。

具体的には、抗体をヒドラジン分解して、抗体から糖鎖を遊離し、2-アミノピリジン (以下、PA と略記する) による糖鎖の蛍光標識 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197 (1984)] を行った後、ゲルろ過により糖鎖を過剰の PA 化試薬などと分離し、逆相クロマトグラフィーを行う。次いで、分取した糖鎖の各ピークについて順相クロマトグラフィーを行う。これらの結果をもとに、2次元糖鎖マップ上にプロットし、糖鎖スタンダード (TaKaRa 社製)、文献 [アナリティカル・バイオケミストリー (Anal. Biochem.), 171, 73 (1988)] とのスポットの比較より糖鎖構造を推定することができる。

さらに各糖鎖の MALDI-TOF-MS などの質量分析を行い、2次元糖鎖マップ法により推定される構造を確認することができる。

## 7. 抗体分子の糖鎖構造を識別する免疫学的定量方法

抗体組成物は、抗体の Fc 領域に結合する糖鎖構造が異なった抗体分子から構成されている。Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖を有する抗体組成物は、前記 6 項に記載の抗体分子の糖鎖構造の分析法を用いることにより識別できる。また、レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いることによっても識別できる。

レクチンを用いた免疫学的定量方法を用いた抗体分子の糖鎖構造の識別は、文献 [モノクローナル・アンティボディズ：プリンシプルズ・アンド・アプリケーションズ (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications), Wiley-Liss, Inc. (1995); 酵素免疫測定法, 第 3 版, 医学書院 (1987); 改訂版, 酵素抗体法, 学際企画 (1985)] 等に記載のウエスタン染色、RIA (Radioimmunoassay)、VIA (Viroimmunoassay)、EIA (Enzymoimmunoassay)、FIA (Fluoroimmunoassay)、MIA

(Metalloimmunoassay) などの免疫学的定量方法に準じて、例えば、以下のように行うことができる。

抗体組成物を構成する抗体分子の糖鎖構造を認識するレクチンを標識し、標識したレクチンと試料である抗体組成物を反応させる。次に、標識したレクチンと抗体分子の複合体の量を測定する。

抗体分子の糖鎖構造を識別に用いられるレクチンとしては、例えば、WGA (T. vulgaris 由来の wheat-germ agglutinin)、ConA (C. ensiformis 由来の concanavalin A)、RIC (R. communis 由来の毒素)、L-PHA (P. vulgaris 由来の leukoagglutinin)、LCA (L. culinaris 由来の lentil agglutinin)、PSA (P. sativum 由来の Pea lectin)、AAL (Aleuria aurantia Lectin)、ACL (Amaranthus caudatus Lectin)、BPL (Bauhinia purpurea Lectin)、DSL (Datura stramonium Lectin)、DBA (Dolichos biflorus Agglutinin)、EBL (Elderberry Balk Lectin)、ECL (Erythrina cristagalli Lectin)、EEL (Euonymus europaeus Lectin)、GNL (Galanthus nivalis Lectin)、GSL (Griffonia simplicifolia Lectin)、HPA (Helix pomatia Agglutinin)、HHL (Hippeastrum Hybrid Lectin)、Jacalin、LTL (Lotus tetragonolobus Lectin)、LEL (Lycopersicon esculentum Lectin)、MAL (Maackia amurensis Lectin)、MPL (Maclura pomifera Lectin)、NPL (Narcissus pseudonarcissus Lectin)、PNA (Peanut Agglutinin)、E-PHA (Phaseolus vulgaris Erythroagglutinin)、PTL (Psophocarpus tetragonolobus Lectin)、RCA (Ricinus communis Agglutinin)、STL (Solanum tuberosum Lectin)、SJA (Sophora japonica Agglutinin)、SBA (Soybean Agglutinin)、UEA (Ulex europaeus Agglutinin)、VVL (Vicia villosa Lectin)、WFA (Wisteria floribunda Agglutinin) があげられる。

N-グルコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合している糖鎖構造を特異的に認識するレクチンを用いることが好ましく、その具体的な例としては、レンズマメレクチン LCA (Lens Culinaris 由来の Lentil Agglutinin) エンドウマメレクチン PSA (Pisum sativum 由来の Pea Lectin)、ソラマメレクチン VFA (Vicia faba 由来の Agglutinin)、ヒヨロチャワンタケレクチン AAL (Aleuria aurantia 由来の Lectin) をあげることができる。

## 8. 抗体組成物の $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ に対する結合活性を測定する方法

本発明は、抗原と被験抗体組成物とを反応させた後に、抗原と抗体組成物との複合体を  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  とを接触させることを特徴とする測定方法を用いて、抗体組成物の糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出すること、さらに抗体依存性細胞障害活性を検出することに関する。

以下に、本発明で用いる測定方法について詳細に説明する。

抗原をプレートに固定し、被験抗体組成物を反応させる。抗原抗体反応した複合体に、ヒト  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  を反応させる。

反応させるヒト  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  に酵素、放射性同位元素、蛍光などの標識体を付して抗原に結合した抗体との結合活性を免疫学的測定法により測定することができる。

免疫学的測定法としては、イムノアッセイ法、イムノブロットティング法、凝集反応、補体結合反応、溶血反応、沈降反応、金コロイド法、クロマトグラフィー法、免疫染色法など抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも包含されるが、好ましくはイムノアッセイ法があげられる。

また、ヒト  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  をコードする遺伝子に短いペプチドをコードする塩基配列を連結させて遺伝子工学的に発現させることにより、タグの入ったヒト  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  を取得することができる。タグとしては、ヒスチジンなどがあげられる。

したがって、タグ入りのヒト  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  を用いて上記の反応を行った場合には、反応後にタグに対する抗体を反応させ、タグに対する抗体に上記のような標識を施すか、またはタグに対する抗体に結合する標識抗体を用いることにより、感度の高いイムノアッセイ法を行うことができる。

本発明の検出法は、抗原と被験抗体組成物とを反応させずに、被験抗体組成物を直接  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  と接触させて行うこともできる。例えば、タグに対する抗体を固相化し、タグ入りのヒト  $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$  と反応させた後に被験抗体組成物を反応させて、ヒト  $\text{Fc}$  領域を認識する標識抗体で検出することができる。

抗体組成物の糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法としては、以下の方法で行う。

最初に、ある抗体組成物について糖鎖分析を行い、検量線を引くために必要な数だけ糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合の異なる抗体組成物（スタンダード）を用意する。その際に用いる抗体組成物の濃度は予め一定にする。用意した抗体組成物のサンプルについて上記測定

方法を用いて、Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性をそれぞれ測定し、糖鎖の割合と Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性との検量線を作成する。

以上の検量線を用いることにより、測定したいサンプルの抗体組成物の濃度を一定にして上記と同様の測定方法を用いて、Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を測定することにより、サンプルの抗体組成物の糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を求めることができる。

さらに ADCC 活性を検出するためには、以下の方法で行う。

上述の抗体組成物の糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法で用いた検量線を作成するために用いたスタンダードについて ADCC 活性を測定する。測定方法としては、後述の ADCC 測定方法を用いる。用意した抗体組成物のサンプルについて上記測定方法を用いて、Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性をそれぞれ測定し、ADCC 活性と Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性との検量線を作成する。

以上の検量線を用いることにより、測定したいサンプルの抗体組成物の濃度を一定にして上記と同様の測定方法を用いて、Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を測定することにより、ADCC 活性を求めることができる。

## 8. 抗体組成物のスクリーニング方法

本発明は、抗原と被験抗体とを反応させた後に、Fc $\gamma$ RIIIa とを接触させることを特徴とする、Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性の高い抗体組成物をスクリーニングする方法に関する。

以下に、本発明のスクリーニング方法について詳細に説明する。

抗原をプレートに固定し、被験抗体を反応させる。抗原抗体反応した複合体に、ヒト Fc $\gamma$ RIIIa を反応させる。

反応させるヒト Fc $\gamma$ RIIIa に酵素、放射性同位元素、蛍光などの標識体を付して抗原に結合した抗体との結合活性を免疫学的測定法により測定することができる。

免疫学的測定法としては、イムノアッセイ法、イムノブロットイング法、凝集反応、補体結合反応、溶血反応、沈降反応、金コロイド法、クロマトグラフィー法、免疫染色法など抗原抗体反応を利用した方法であればいかなるものも包含されるが、好ましくはイムノアッセイ法があげられる。

また、ヒト Fc $\gamma$ RIIIa をコードする遺伝子に短いペプチドをコードする塩基配列を連結させて遺伝子工学的に発現させることにより、タグの入ったヒト Fc $\gamma$ RIIIa を取得することができる。タグとしては、ヒスチジンなどがあげられる。

したがって、タグ入りのヒト Fc $\gamma$ RIIIa を用いて上記の反応を行った場合には、反応後にタグに対する抗体を反応させ、タグに対する抗体に上記のような標識を施すか、またはタグに対する抗体に結合する標識抗体を用いることにより、感度の高いイムノアッセイ法を行うことができる。

#### 10. 本発明の抗体組成物の利用

本発明のスクリーニング方法で得られた抗体組成物は高い ADCC 活性を有する。高い ADCC 活性を有する抗体は、癌、炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患、循環器疾患、またはウィルスあるいは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療において有用である。

癌、すなわち悪性腫瘍は癌細胞が増殖する。通常、抗癌剤は癌細胞の増殖を抑制することを特徴とする。しかし、高い ADCC 活性を有する抗体は、殺細胞効果により癌細胞を障害することにより癌を治療することができるため、通常、抗癌剤よりも治療薬として有効である。特に癌の治療薬において、現状では抗体医薬単独の抗腫瘍効果は不十分であり、化学療法との併用療法が行われているが [サイエンス (Science), 280, 1197 (1998)]、本発明の方法で得られた抗体組成物単独でのより強い抗腫瘍効果が認められれば、化学療法に対する依存度が低くなり、副作用の低減にもなる。

炎症疾患、自己免疫疾患、アレルギーなどの免疫疾患において、それらの疾患における生体内反応は、免疫細胞によるメディエータ分子の放出により惹起されるため、高い ADCC 活性を有する抗体を用いて免疫細胞を除去することにより、アレルギー反応を抑えることができる。

循環器疾患としては、動脈硬化などがあげられる。動脈硬化は、現在バルーンカテーテルによる治療を行うが、治療後の再狭窄での動脈細胞の増殖を高い ADCC 活性を有する抗体を用いて抑えることより、循環器疾患を予防および治療することができる。

ウィルスまたは細菌に感染細胞を、高い ADCC 活性を有する抗体を用いてウィルスまたは細菌に感染細胞の増殖を抑えることにより、ウィルスまたは細菌感染をはじめとする各種疾患の予防および治療することができる。

腫瘍関連抗原を認識する抗体、アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体、またはウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体の具体例を以下に述べる。。

腫瘍関連抗原を認識する抗体としては、抗 GD2 抗体 [アンチ・キャンサー・リサーチ (Anticancer Res.), 13, 331 (1993)]、抗 GD3 抗体 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 260 (1993)]、抗 GM2 抗体 [キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 54, 1511 (1994)]、抗 HER2 抗体 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 89, 4285 (1992)]、抗 CD52 抗体 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 89, 4285 (1992)]、抗 MAGE 抗体 [ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・キャンサー (British J. Cancer), 83, 493 (2000)]、抗 HM1.24 抗体 [モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunol.), 36, 387 (1999)]、抗副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) 抗体 [キャンサー (Cancer), 88, 2909 (2000)]、抗塩基性線維芽細胞増殖因子抗体、抗線維芽細胞増殖因子 8 抗体 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 86, 9911 (1989)]、抗塩基性繊維芽細胞増殖因子受容体抗体、抗線維芽細胞増殖因子 8 受容体抗体 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 265, 16455 (1990)]、抗インスリン様増殖因子抗体 [ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・リサーチ (J. Neurosci. Res.), 40, 647 (1995)]、抗インスリン様増殖因子受容体抗体 [ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・リサーチ (J. Neurosci. Res.), 40, 647 (1995)]、抗 PMSA 抗体 [ジャーナル・オブ・ウロロジー (J. Urology), 160, 2396 (1998)]、抗血管内皮細胞増殖因子抗体 [キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 57, 4593 (1997)]、抗血管内皮細胞増殖因子受容体抗体 [オンコジーン (Oncogene), 19, 2138 (2000)]などがあげられる。

アレルギーあるいは炎症に関連する抗原を認識する抗体としては、抗インターロイキン 6 抗体 [イムノロジカル・レビューズ (Immunol. Rev.), 127, 5 (1992)]、抗インターロイキン 6 受容体抗体 [モレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunol.), 31, 371 (1994)]、抗インターロイキン 5 抗体 [イムノロジカル・レビューズ (Immunol. Rev.), 127, 5 (1992)]、抗インターロイキン 5 受容体抗体、抗インターロイキン 4 抗体 [サイトカイン (Cytokine), 3, 562

(1991)]、抗インターロイキン 4 受容体抗体 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 217, 41 (1998)]、抗腫瘍壊死因子抗体 [ハイブリドーマ (Hybridoma), 13, 183 (1994)]、抗腫瘍壊死因子受容体抗体 [モレキュラー・ファーマコロジー (Molecular Pharmacol.), 58, 237 (2000)]、抗 CCR4 抗体 [ネイチャー (Nature), 400, 776, (1999)]、抗ケモカイン抗体 [J. Immunol. Meth., 174, 249-257 (1994)] または抗ケモカイン受容体抗体 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Exp. Med.), 186, 1373 (1997)] であり、循環器疾患に関連する抗原を認識する抗体が抗 GPIIb/IIIa 抗体 [ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunol.), 152, 2968 (1994)]、抗血小板由来増殖因子抗体 [サイエンス (Science), 253, 1129 (1991)]、抗血小板由来増殖因子受容体抗体 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 272, 17400 (1997)]、抗血液凝固因子抗体 [サーキュレーション (Circulation), 101, 1158 (2000)]などがあげられる。

ウイルスあるいは細菌感染に関連する抗原を認識する抗体としては、抗 gp120 抗体 [ストラクチャー (Structure), 8, 385 (2000)]、抗 CD4 抗体 [ジャーナル・オブ・リウマトロジー (J. Rheumatology), 25, 2065 (1998)]、抗 CCR5 抗体、抗ペロ毒素抗体 [ジャーナル・オブ・クリニカル・マイクروバイオロジー (J. Clin. Microbiol.), 37, 396 (1999)] などがあげられる。

上記抗体は、ATCC (The American Type Culture Collection)、理化学研究所細胞開発銀行、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター等の公的な機関、あるいは大日本製薬株式会社、R&D SYSTEMS 社、PharMingen 社、コスモバイオ社、フナコシ株式会社等の民間試薬販売会社からも入手することができる。

本発明の方法で得られた抗体組成物は、種々の疾患治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適切な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適切な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製される。または、抗体組成物を常法に従って凍結乾燥し、これに塩化ナトリウムを加えることによって粉末注射剤を調製することもできる。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体組成物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体組成物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該抗体組成物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、有効成分の量として、通常成人 1 日当たり  $10 \mu\text{g/kg}$  ~  $20\text{mg/kg}$  である。

また、抗体組成物の各種腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を検討する方法は、インビトロ実験としては、CDC 活性測定法、ADCC 活性測定法等があげられ、インビボ実験としては、マウス等の実験動物での腫瘍系を用いた抗腫瘍実験等があげられる。



CDC 活性、ADCC 活性、抗腫瘍実験は、文献 [キャンサー・イムノロジー・イムノセラピー (Cancer Immunol. Immunother.), 36, 373 (1993) ; キャンサー・リサーチ (Cancer Research), 54, 1511 (1994)] 等記載の方法に従って行うことができる。

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体の SDS-PAGE (4~15%グラジェントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した写真である。第 1A 図が非還元条件、第 1B 図が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った写真である。レーン 1 が高分子量マーカー、2 が YB2/0-GD3 キメラ抗体、3 が CHO/DG44-GD3 キメラ抗体、4 が SP2/0-GD3 キメラ抗体、5 が NS0-GD3 キメラ抗体 (302)、6 が NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT)、7 が低分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第 2 図は、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 との結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は GD3 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-GD3 キメラ抗体、●が CHO/DG44-GD3 キメラ抗体、□が SP2/0-GD3 キメラ抗体、■が NS0-GD3 キメラ抗体 (302)、△が NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) の活性をそれぞれ示す。

第 3 図は、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が YB2/0-GD3 キメラ抗体、●が CHO/DG44-GD3 キメラ抗体、□が SP2/0-GD3 キメラ抗体、■が NS0-GD3 キメラ抗体 (302)、△が NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) の活性をそれぞれ示す。

第 4 図は、ロット 2 の抗 GD3 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 5 図は、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は GD3 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体 (50%)、□が抗 GD3 キメラ抗

体(45%)、■が抗 GD3 キメラ抗体 (29%)、△が抗 GD3 キメラ抗体 (24%)、▲が抗 GD3 キメラ抗体 (13%)、×が抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の活性をそれぞれ示す。

第 6 図は、各ドナーのエフェクター細胞を用いた ADCC 活性の結果である。第 6A 図はドナーA、第 6B 図はドナーB のエフェクター細胞を用いた、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。●が抗 GD3 キメラ抗体 (50%)、□が抗 GD3 キメラ抗体 (45%)、■が抗 GD3 キメラ抗体 (29%)、△が抗 GD3 キメラ抗体 (24%)、▲が抗 GD3 キメラ抗体 (13%)、×が抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の活性をそれぞれ示す。

第 7 図は、ドナーA およびドナーB の還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖含量と ADCC 活性とを示した図である。

第 8 図は、6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示したものである。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 9 図は、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が異なる 6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4 に対する結合活性を抗体濃度を変化させて測定した図である。縦軸は CCR4 との結合活性、横軸は抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体(46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 10 図は、ドナーA のエフェクター細胞を用いた、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が異なる抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4/EL-4 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。エフェクター細胞には、ドナーA のエフェクター細胞を用いた。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 11 図は、ドナーB のエフェクター細胞を用いた、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が異なる抗 CCR4

キメラ抗体の CCR4/EL-4 細胞に対する ADCC 活性を示した図である。エフェクター細胞には、ドナーB のエフェクター細胞を用いた。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、○が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 12 図は、プラスミド CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 13 図は、プラスミド CHAc-pBS および YBAc-pBS の構築を示した図である。

第 14 図は、プラスミド CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 の構築を示した図である。

第 15 図は、プラスミド CHAc-d-pBS および YBAc-d-pBS の構築を示した図である。

第 16 図は、競合的 PCR 法を用いた各宿主細胞株における  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 転写産物量の定量結果を示した図である。ラット FUT8 配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株における FUT8 転写産物の量を示す。■が CHO 細胞株、□が YB2/0 細胞株を宿主細胞として用いた結果をそれぞれ示す。

第 17 図は、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を評価した結果を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□は 5-03 株、■は CHO/CCR4-LCA 株、◆は CHO/CCR4-AAL 株、▲は CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。

第 18 図は、レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を評価した結果を示したものである。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。□は YB2/0 株 (KM2760#58-35-16)、△は 5-03 株、●は CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体の活性をそれぞれ示す。

第 19 図は、精製した抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。27A 図は 5-03 株が生産する抗体、27B 図は CHO/CCR4-LCA 株が生産する抗体、27C 図は CHO/CCR4-AAL 株が生産する抗体、および 27D 図は CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体の分析結果を示す。

第 20 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築 (全 6 工程) の第 1 の工程を示した図である。

第 21 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 2 の工程を示した図である。

第 22 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 3 の工程を示した図である。

第 23 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 4 の工程を示した図である。

第 24 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 5 の工程を示した図である。

第 25 図は、CHO 細胞由来 GMD の発現ベクター構築（全 6 工程）の第 6 の工程を示した図である。

第 26 図は、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する耐性度を示した図である。LCA レクチンを添加せずに培養した細胞群の生存率を 100%とし、2 回測定を行った図である。図中 249 は、発現ベクター pAGE249 を導入した CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する生存率を示す。GMD は GMD 発現ベクター pAGE249GMD を導入した CHO/CCR4-LCA 株の LCA レクチンに対する耐性度を示す。

第 27 図は、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の細胞群が生産した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。

第 28 図は、GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より精製した抗 CCR4 キメラ抗体から調製した PA 化糖鎖を、逆相 HPLC で分析して得た溶離図を示した図である。縦軸に相対蛍光強度、横軸に溶出時間をそれぞれ示す。

第 29 図は、精製した shFc $\gamma$ RIIIa の還元条件下での SDS-PAGE（4～15%グラジエントゲルを使用）の電気泳動パターンを示した写真である。レーン 1 が shFc $\gamma$ RIIIa、レーン M が分子量マーカーの泳動パターンをそれぞれ示す。

第 30 図は、各種抗 GD3 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗 GD3 キメラ抗体（45%）、●が抗 GD3 キメラ抗体（7%）の活性をそれぞれ示す。

第 31 図は、各種抗抗線維芽細胞増殖因子-8（FGF-8）キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗 FGF-8 キメラ抗体（58%）、●が抗 FGF-8 キメラ抗体（13%）の活性をそれぞれ示す。

第 32 図は、各種抗 CCR4 キメラ抗体の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性を示した図である。第 32A 図は、縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗 CCR4 キメラ抗体 (87%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (46%)、□が抗 CCR4 キメラ抗体 (39%)、■が抗 CCR4 キメラ抗体 (27%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (18%)、▲が抗 CCR4 キメラ抗体 (9%)、×が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。第 32B 図は、縦軸に結合活性、横軸に還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合をそれぞれ示した結果である。●が抗体濃度が 40  $\mu$ g/mL、○が抗体濃度が 4  $\mu$ g/mL の活性をそれぞれ示す。

第 33 図は、各種抗 CCR4 キメラ抗体の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。○が抗 CCR4 キメラ抗体 (87%)、△が抗 CCR4 キメラ抗体 (48%)、●が抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) の活性をそれぞれ示す。

第 34 図は、各種抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 に対する ADCC 活性を示した図である。縦軸に細胞障害活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。▲が抗 GD3 キメラ抗体 (42%)、●が抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の活性をそれぞれ示す。

第 35 図は、FGF-8/Fc 融合蛋白質の KM1334 に対する結合活性を測定した結果を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が YB2/0 細胞株、○が CHO/DG44 細胞株を宿主細胞として生産された FGF-8/Fc 融合蛋白質の活性の結果をそれぞれ示す。

第 36 図は、各種の FGF-8/Fc 融合蛋白質の shFc  $\gamma$  RIIIa (V) に対する結合活性を測定した結果を示した図である。縦軸に結合活性、横軸に抗体濃度をそれぞれ示す。■が YB2/0 細胞株、○が CHO/DG44 細胞株を宿主細胞として生産された FGF-8/Fc 融合蛋白質の活性の結果をそれぞれ示す。

第 37 図は、CHO 細胞由来の GMD cDNA クローン 22-8 の 5' 末端にクローン 34-2 の 5' 末端を導入したプラスミド CHO-GMD の作製工程を示した図である。

第 38 図は、プラスミド pKANTEX1334H およびプラスミド pKANTEX1334 の造成工程を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

## 実施例 1. 抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体の作製

### 1. 抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 の構築

抗ガングリオシド GD3 ヒト型キメラ抗体（以下、抗 GD3 キメラ抗体と表記する）の L 鎖の発現ベクター pChi641LGM4 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)] を制限酵素 MluI（宝酒造社製）と SalI（宝酒造社製）で切断して得られる L 鎖 cDNA を含む約 4.03kb の断片と動物細胞用発現ベクター pAGE107 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] を制限酵素 MluI（宝酒造社製）と SalI（宝酒造社製）で切断して得られる G418 耐性遺伝子およびスプライシングシグナルを含む約 3.40kb の断片を DNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて連結、大腸菌 HB101 株（モレキュラー・クローニング第 2 版）を形質転換してプラスミド pChi641LGM40 を構築した。

次に、上記で構築したプラスミド pChi641LGM40 を制限酵素 ClaI（宝酒造社製）で切断後、DNA Blunting Kit（宝酒造社製）を用いて平滑末端化し、更に MluI（宝酒造社製）で切断して得られる L 鎖 cDNA を含む約 5.68kb の断片と抗 GD3 キメラ抗体の H 鎖の発現ベクター pChi641HGM4 [ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (J. Immunol. Methods), 167, 271 (1994)] を制限酵素 XhoI（宝酒造社製）で切断後、DNA Blunting Kit（宝酒造社製）を用いて平滑末端化し、更に MluI（宝酒造社製）で切断して得られる H 鎖 cDNA を含む約 8.40kb の断片を DNA Ligation Kit（宝酒造社製）を用いて連結、大腸菌 HB101 株（モレキュラー・クローニング第 2 版）を形質転換して抗 GD3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 を構築した。

### 2. 抗 GD3 キメラ抗体の安定生産細胞の作製

上記実施例 1 の 1 項で構築した抗 GD3 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pChi641LHGM4 を各種細胞株に導入し、優良株を選択することで抗 GD3 キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

#### (1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の 5  $\mu$ g を  $4 \times 10^6$  細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞 [ATCC CRL-1662、ジャーナル・オブ・セルラー・バイオロジ

ー(J. Cell. Biol.), 93, 576 (1982)] ヘエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40mL の RPMI1640-FBS(10) [10%牛胎児血清 (以下、FBS と表記する ; GIBCO BRL 社製) を含む RPMI1640 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200  $\mu$ L/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/mL、DHFR の阻害剤であるメソトレキセート (以下、MTX と表記する ; SIGMA 社製) を 50nmol/L 含む RPMI1640-FBS(10) 培地に 1~2 $\times 10^5$  細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2mL ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nmol/L、200nmol/L と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nmol/L の濃度で含む RPMI1640-FBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法による単一細胞化 (クローン化) を行った。

このようにして得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン 7-9-51 は平成 11 年 4 月 5 日付で工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) (現・独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6)) に FERM BP-6691 として寄託されている。

## (2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の 4  $\mu$ g を 1.6 $\times 10^6$  細胞の CHO/DG44 細胞 [プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・

サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77, 4216 (1980)] ヘエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10mL の IMDM-FBS(10)-HT(1) [FBS を 10%、HT supplement (GIBCO BRL 社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に 200  $\mu$ L/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/mL、MTX を 10nmol/L 含む IMDM-dFBS(10) 培地 [10%透析牛胎児血清 (以下、dFBS と表記する ; GIBCO BRL 社製) を含む IMDM 培地] に 1~2 $\times 10^5$ 細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェルプレート (岩城硝子社製) に 0.5mL ずつ分注した。5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、10nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nmol/L に上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/mL、MTX を 100nmol/L の濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法によるクローン化を行った。

### (3) マウスミエローマ NS0 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 GD3 キメラ抗体発現ベクター pChi641LHGM4 の 5  $\mu$ g を 4 $\times 10^6$ 細胞のマウスミエローマ NS0 細胞ヘエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40mL の EX-CELL302-FBS(10) [10%FBS、2mmol/L L-グルタミン (以下、L-Gln と表記する ; GIBCO BRL 社製) を含む EX-CELL302 培地] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200  $\mu$ L/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。



培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/mL、MTX を 50nmol/L 含む EX-CELL302-dFBS(10) 培地 (10%dFBS、2mmol/L L-Gln を含む EX-CELL302 培地) に  $1\sim 2\times 10^5$  細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2mL ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃で 1~2 週間培養して、50nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 GD3 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に抗 GD3 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nmol/L、200nmol/L と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nmol/L の濃度で含む EX-CELL302-dFBS(10) 培地で増殖可能かつ、抗 GD3 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株の中から優良株を選択し、2 回の限界希釈法によるクローン化を行った。

### 3. 抗体の GD3 に対する結合活性の測定 (ELISA 法)

抗体の GD3 に対する結合活性は以下のようにして測定した。

4nmol の GD3 (雪印乳業社製) を 10  $\mu$ g のジパルミトイルフォスファチジルコリン (SIGMA 社製) と 5  $\mu$ g のコレステロール (SIGMA 社製) とを含む 2mL のエタノール溶液に溶解した。該溶液の 20  $\mu$ L (40pmol/ウェルとなる) を 96 ウェルの ELISA 用のプレート (Greiner 社製) の各ウェルにそれぞれ分注し、風乾後、1% 牛血清アルブミン (以下、BSA と表記する ; SIGMA 社製) を含む PBS (以下、1% BSA-PBS と表記する) を 100  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清或いは精製したヒト型キメラ抗体の各種希釈溶液を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを 0.05%Tween20 (和光純薬社製) を含む PBS (以下、Tween-PBS と表記する) で洗浄後、1%BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (H&L) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムの 0.55g を 1L の 0.1mol/L クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素を 1  $\mu$ L/mL で添加した溶液 (以下、同様)] を 50  $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、415nm の吸光度 (以下、OD415 と表記する) を測定した。

#### 4. 抗 GD3 キメラ抗体の精製

##### (1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (1) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを BSA を 0.2%、MTX を 200nmol/L、トリヨードチロニン（以下、T3 と表記する；SIGMA 社製）を 100nmol/L の濃度で含む Hybridoma-SFM 培地に  $3 \times 10^5$  細胞/mL となるように懸濁し、2.0L スピナーボトル（岩城硝子社製）を用いて 50rpm の速度で攪拌培養した。37℃の恒温室内で 10 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A（Bioprocessing 社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、YB2/0-GD3 キメラ抗体と名付けた。

##### (2) CHO/DG44 細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (2) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを L-Gln を 3mmol/L、脂肪酸濃縮液（以下、CDLC と表記する；GIBCO BRL 社製）を 0.5%、プルロニック F68（以下、PF68 と表記する；GIBCO BRL 社製）を 0.3% の濃度で含む EX-CELL302 培地に  $1 \times 10^6$  細胞/mL となるように懸濁し、175mm<sup>2</sup> フラスコ（Greiner 社製）に 50mL ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃で 4 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A（Bioprocessing 社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、CHO/DG44-GD3 キメラ抗体と名付けた。

##### (3) NS0 細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

上記実施例 1 の 2 項 (3) で得られた抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローンを L-Gln を 2mmol/L、G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nmol/L、dFBS を 1% の濃度で含む EX-CELL302 培地に  $1 \times 10^6$  細胞/mL となるように懸濁し、175mm<sup>2</sup> フラスコ（Greiner 社製）に 200mL ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃で 4 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A（Bioprocessing 社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、NS0-GD3 キメラ抗体 (302) と名付けた。

また、該形質転換細胞クローンを G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nmol/L の濃度で含む GIT 培地に  $3 \times 10^5$  細胞/mL となるように懸濁し、175mm<sup>2</sup> フラスコ（Greiner

社製) に 200mL ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃で 10 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) と名付けた。

#### (4) SP2/0 細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

特開平 5-304989 (EP533199) に記載の抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン (KM-871 (FERM BP-3512)) を G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nmol/L の濃度で含む GIT 培地に  $3 \times 10^5$  細胞/mL となるように懸濁し、175mm<sup>2</sup> フラスコ (Greiner 社製) に 200mL ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃で 8 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 GD3 キメラ抗体を精製した。精製した抗 GD3 キメラ抗体は、SP2/0-GD3 キメラ抗体と名付けた。

#### 5. 精製した抗 GD3 キメラ抗体の解析

上記実施例 1 の 4 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 5 種類の抗 GD3 キメラ抗体の各 4 $\mu$ g を公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] に従って SDS-PAGE し、分子量および精製度を解析した。その結果を第 1 図に示した。第 1 図に示したように、精製した各抗 GD3 キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150 キロダルトン (以下、Kd と表記する) の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖および L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎖: 約 49Kd、L 鎖: 約 23Kd、分子全体: 約 144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内のジスルフィド結合 (以下、S-S 結合と表記する) が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告 [アンティボディズ, Chapter 14、モノクローナル・アンティボディズ] と一致し、各抗 GD3 キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

## 実施例 2. 抗 GD3 キメラ抗体の活性評価

### 1. 抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性 (ELISA 法)

上記実施例 1 の 4 項で得られた 5 種類の精製抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性を実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。第 2 図は、添加する抗 GD3 キメラ抗体の濃度を変化させて結合活性を検討した結果である。第 2 図に示したように、5 種類の抗 GD3 キメラ抗体は、ほぼ同等の GD3 に対する結合活性を示した。この結果は抗体の抗原結合活性は、抗体を生産する動物細胞やその培養方法に関わらず、一定であることを示している。また、NS0-GD3 キメラ抗体 (302) と NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) の比較から抗原結合活性は、培養に用いる培地にも依らず、一定であることが示唆された。

### 2. 抗 GD3 キメラ抗体の ADCC 活性

上記実施例 1 の 4 項で得られた 5 種類の精製抗 GD3 キメラ抗体の ADCC 活性を以下のようにして測定した。

#### (1) 標的細胞溶液の調製

RPMI1640-FBS(10) 培地で培養したヒトメラノーマ細胞株 G-361 (ATCC CRL1424) の  $1 \times 10^6$  細胞を調製し、放射性物質である  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  を 3.7MBq 当量加えて 37°C で 1 時間反応させ、細胞を放射性物質標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁および遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4°C で 30 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を 5mL 加え、 $2 \times 10^5$  細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

#### (2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人静脈血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム (武田薬品社製) 0.5mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep (Nycomed Pharma AS 社製) を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて  $2 \times 10^6$  細胞/mL の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

## (3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート (Falcon 社製) の各ウェルに上記 (1) で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu\text{L}$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで (2) で調製したエフェクター細胞溶液を  $100 \mu\text{L}$  ( $2 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 20:1 となる) 添加した。更に、各種抗 GD3 キメラ抗体を各種濃度で加え、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに  $1\text{mol/L}$  の塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。ADCC 活性は下式 (1) により求めた。

$$\text{ADCC 活性 (\%)} = \frac{\text{検体上清中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全解離 } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然解離 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100 \quad (1)$$

その結果を第 3 図に示した。第 3 図に示したように、5 種類の抗 GD3 キメラ抗体のうち、YB2/0-GD3 キメラ抗体が最も高い ADCC 活性を示し、次いで SP2/0-GD3 キメラ抗体、NS0-GD3 キメラ抗体、CHO-GD3 キメラ抗体の順に高い ADCC 活性を示した。培養に用いた培地の異なる NS0-GD3 キメラ抗体 (302) と NS0-GD3 キメラ抗体 (GIT) では、それらの ADCC 活性に差は認められなかった。以上の結果は、抗体の ADCC 活性は、生産に用いる動物細胞によって大きく異なることを示している。その機構としては、抗原結合活性が同等であったことから、抗体の Fc 領域の構造の差に起因していることが推測された。

実施例 3. 還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる抗 GD3 キメラ抗体の活性評価

1. 還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる抗 GD3 キメラ抗体の調製

実施例 1 の 2 項 (1) に記載した方法に従って、抗 GD3 キメラ抗体を生産する YB2/0 細胞由来の形質転換クローンを複数得た。それぞれの YB2/0 細胞由来の形質転換クローンより精製抗体を調製し、それぞれをロット 1、ロット 2、ロット 3

とした。抗 GD3 キメラ抗体ロット 1、ロット 2、ロット 3 の糖鎖分析を、以下の方法に従って行った。

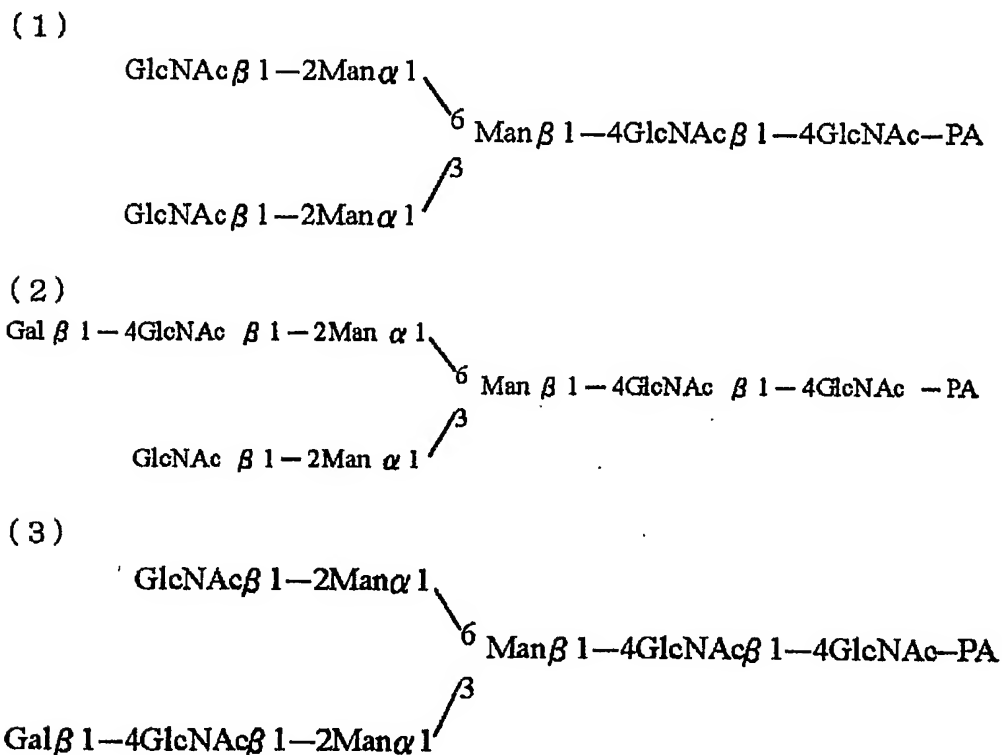
精製したそれぞれの抗体を、ウルトラフリー-0.5-10K（ミリポア社製）を用いて 10mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  に溶液を置換した。置換倍率は 80 倍以上になるように行なった。

100  $\mu\text{g}$  の抗体をヒドラクラブ S-204 用試験管に入れ、遠心濃縮機にて乾固した。サンプルを乾固後、ホーネン社製ヒドラクラブにてヒドラジン分解を行なった。ヒドラジンはホーネン社製ヒドラジン分解試薬を用い、110℃、1 時間反応させた [メソッド・オブ・エンザイモロジー (Method of Enzymology), 83, 263 (1982)]。反応後ヒドラジンを減圧留去させて、反応容器を 30 分間放置して室温に戻した。ホーネン社製アセチル化試薬の acetylation reagent を 250  $\mu\text{L}$ 、無水酢酸を 25  $\mu\text{L}$  入れてよく攪拌させ、室温で 30 分間反応させた。さらに acetylation reagent を 250  $\mu\text{L}$ 、無水酢酸を 25  $\mu\text{L}$  加えてよく攪拌させ、室温で 1 時間反応させた。試料を -80℃ のフリーザーで凍結させ、約 17 時間凍結乾燥させた。凍結乾燥した試料から、TaKaRa 社製セルロースカートリッジ グリカンプレパレーションキットを用いて糖鎖を回収した。試料糖鎖溶液を遠心濃縮機にて乾固後、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 95, 197 (1984)]。2-アミノピリジン溶液は 2-アミノピリジン 1g に対し塩酸溶液の 760  $\mu\text{L}$  を加え (1×PA 溶液)、その溶液を逆浸透精製水で 10 倍に希釈したものをを用いた (10 倍希釈 PA 溶液)。シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液は、シアノ水素化ホウ素ナトリウム 10mg に対し 1×PA 溶液 20  $\mu\text{L}$ 、逆浸透精製水 430  $\mu\text{L}$  を加えて調製した。試料に 10 倍希釈 PA 溶液を 67  $\mu\text{L}$  入れて 100℃、15 分間反応させ、放冷後にシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液を 2  $\mu\text{L}$  入れて 90℃、12 時間反応させて試料糖鎖を蛍光標識した。蛍光標識した糖鎖群 (PA 化糖鎖群) を、Surperdex Peptide HR 10/30 カラム (Pharmacia 社製) を用いて過剰な試薬と分離した。溶離液は 10mmol/L 炭酸水素アンモニウム、流速は 0.5mL/分、カラム温度は室温、蛍光検出器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なった。試料添加後 20 分から 30 分の溶出液を回収し、遠心濃縮機にて乾固させ、精製 PA 化糖鎖群とした。

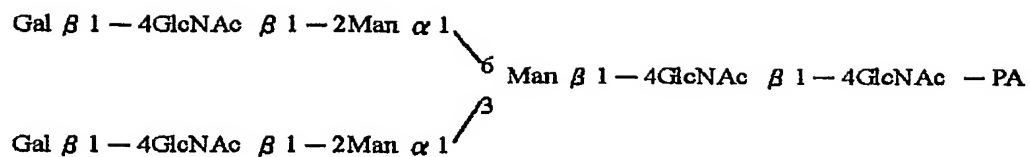
次に、CLC-ODS カラム (Shimadzu 社製、 $\phi 6.0\text{nm} \times 150\text{nm}$ ) を用いて、精製 PA 化糖鎖群の逆相 HPLC 分析を行った。カラム温度は 55℃、流速は 1mL/分、蛍光検出器は励起波長 320nm、蛍光波長 400nm で行なった。10mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH3.8) でカラムを平衡化し、0.5%1-ブタノールの直線濃度勾配にて 80 分

間溶出した。第 4 図にロット 2 の抗 GD3 キメラ抗体の精製 PA 化糖鎖群の溶離図を示した。各 PA 化糖鎖の同定は、分取した各 PA 化糖鎖のピークのマトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS 分析) におけるポストソース分解 (Post Source Decay) 分析、TaKaRa 社製 PA 化糖鎖スタンダードとの溶出位置の比較、並びに各種酵素を用いて各 PA 化糖鎖を消化後、逆相 HPLC 分析により行なった。

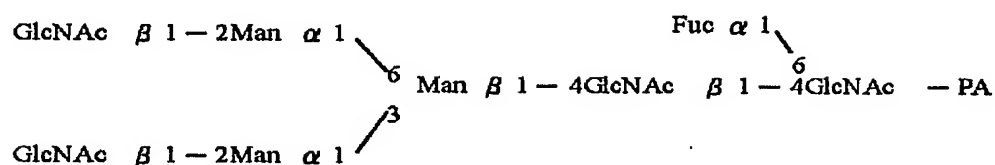
糖鎖含量は、逆相 HPLC 分析における各 PA 化糖鎖のピーク面積より算出した。還元末端が N-アセチルグルコサミンでない PA 化糖鎖は、不純物由来であるか、PA 化糖鎖調製中の副反応物であるため、ピーク面積の算出から除外した。なお、図中の (i) ~ (ix) のピークは、それぞれ以下の糖鎖構造 (1) ~ (9) を示す。



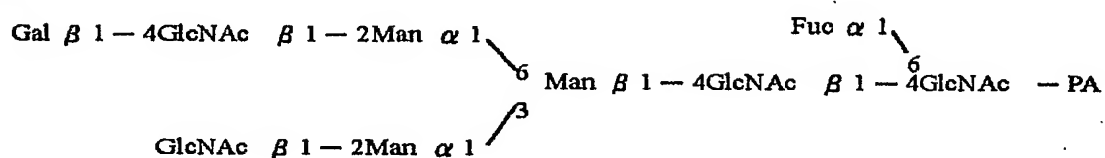
(4)



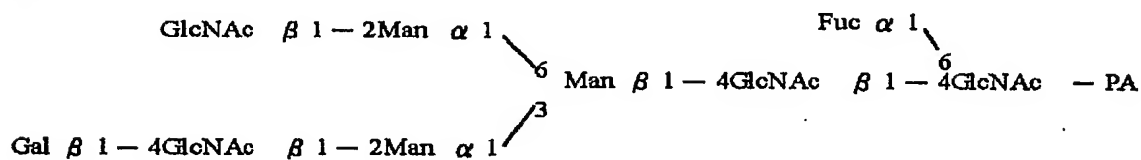
(5)



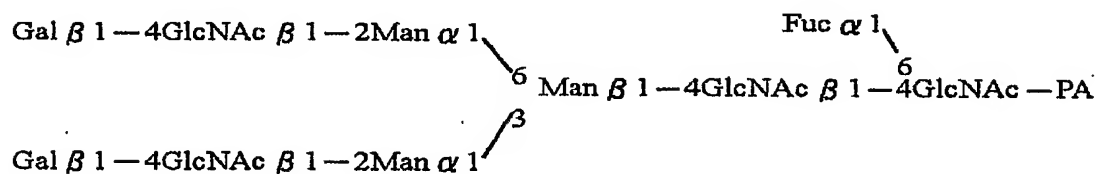
(6)



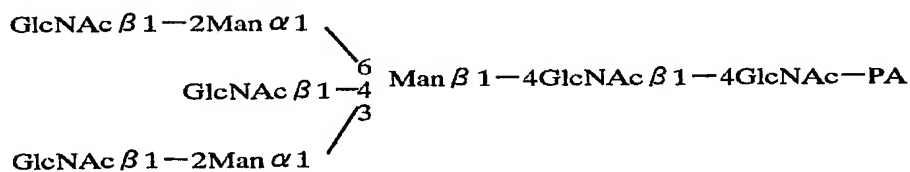
(7)



(8)



(9)





GlcNAc は N-アセチルグルコサミン、Gal はガラクトース、Man はマンノース、Fuc はフコース、PA はピリジルアミノ基を示す。第 4 図において、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない群の割合は、(i)～(ix)のうち(i)～(iv)のピークが占める面積、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖群の割合は、(i)～(ix)のうち(v)～(ix)のピークが占める面積から算出した。それぞれの糖鎖群の割合は、2 回の糖鎖分析の結果を平均した値を用いた。

その結果、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、ロット 1、ロット 2、ロット 3、それぞれ 50%、45%、29%であった。以下、これらの試料を、抗 GD3 キメラ抗体 (50%)、抗 GD3 キメラ抗体(45%)、抗 GD3 キメラ抗体 (29%) と表記する。

また、実施例 1 の 2 項 (2) で調製した CHO/DG44 細胞由来の抗 GD3 キメラ抗体の糖鎖分析を上記記載の方法に従って行った結果、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、7%であった。以下、本試料を抗 GD3 キメラ抗体 (7%) と表記する。

さらに、抗 GD3 キメラ抗体 (45%) と抗 GD3 キメラ抗体 (7%) を用い、抗 GD3 キメラ抗体 (45%):抗 GD3 キメラ抗体 (7%)=5:3 および 1:7 の割合で混合した。これらの試料を、上記記載の方法に従って糖鎖分析を行った結果、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、24%および 13%であった。これらの試料を以下、抗 GD3 キメラ抗体 (24%)、抗 GD3 キメラ抗体 (13%) と表記する。

## 2. 抗体の GD3 に対する結合活性の評価 (ELISA 法)

実施例 3 の 1 項で調製した還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体の GD3 に対する結合活性は、実施例 1 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。その結果、第 5 図に示したように、6 種類の抗 GD3 キメラ抗体は、いずれも同等の GD3 に対する結合活性を示し、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

### 3. ヒトメラノーマ細胞株に対する ADCC 活性の評価

実施例 3 の 1 項で調製した還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる 6 種類の抗 GD3 キメラ抗体のヒトメラノーマ細胞株 G-361 (ATCC CRL1424) に対する ADCC 活性は、実施例 2 の 2 項に記載の方法に従って測定した。

第 6 図および第 7 図には、2 名の健常人ドナー (A、B) のエフェクター細胞を用いて ADCC 活性を測定した結果をそれぞれ示した。第 6 図および第 7 図に示したように、抗 GD3 キメラ抗体の ADCC 活性は、いずれの抗体濃度においても還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC 活性は低下する。

抗体濃度が  $0.05 \mu\text{g/mL}$  では、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖が 24%、29%、45%および 50%の ADCC 活性はほぼ同様の高い活性を示したが、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖が 20%未満の抗体である、13%および 7%では、ADCC 活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。

実施例 4. 還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の活性評価

#### 1. 抗 CCR4 キメラ抗体の安定生産細胞の作製

WO01/64754 に記載の抗 CCR4 キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pKANTEX2160 を用いて抗 CCR4 キメラ抗体の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

##### (1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2160 の  $10 \mu\text{g}$  を  $4 \times 10^6$  細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞 (ATCC CRL1662) ヘエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40mL の Hybridoma-SFM-FBS(5) [FBS (PAA ラボラトリーズ社製) を 5%含む Hybridoma-SFM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に  $200 \mu\text{L}$ /ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を  $1\text{mg/mL}$  になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清

を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 4 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 1mg/mL、DHFR の阻害剤である MTX (SIGMA 社製) を 50nmol/L 含む Hybridoma-SFM-FBS (5) 培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 1mL ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 4 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を上昇させ、最終的に MTX を 200nmol/L の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS (5) 培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株について、2 回の限界希釈法によるクローン化を行い、得られた形質転換細胞クローンを KM2760#58-35-16 と名付けた。

## (2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 CCR4 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX2160 の 4  $\mu$ g を  $1.6 \times 10^6$  細胞の CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、10mL の IMDM-dFBS (10)-HT (1) [dFBS (インビトロジェン社製) を 10%、HT supplement (インビトロジェン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に 100  $\mu$ L/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、IMDM-dFBS (10) (dFBS を 10% で含む IMDM 培地) に培地交換し、1~2 週間培養した。HT 非依存的な増殖を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 CCR4 キメラ抗体の発現量を実施例 4 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 CCR4 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、MTX を 50nmol/L 含む IMDM-dFBS (10) 培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェルプレート (岩城硝子社製) に 0.5mL ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベータ

一内で 37℃で 1～2 週間培養して、50nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 200nmol/L に上昇させ、最終的に MTX を 200nmol/L の濃度で含む IMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、抗 CCR4 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。得られた形質転換株は 5-03 株と名付けた。

## 2. 抗体の CCR4 部分ペプチドに対する結合活性 (ELISA 法)

抗 CCR4 キメラ抗体が反応し得るヒト CCR4 細胞外領域ペプチドとして化合物 1 (配列番号 25) を選択した。ELISA 法による活性測定に用いるため、以下の方法で BSA (ナカライテスク社製) とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、10 mg の BSA を含む PBS 溶液 900 mL に、100mL の 25mg/mL SMCC [4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシリクアシッド N-ヒドロキシサクシンイミドエステル] (シグマ社製)-DMSO 溶液を攪拌しながら滴下し、30 分間ゆっくりと攪拌した。25 mL の PBS で平衡化した NAP-10 カラムなどのゲルろ過カラムに反応液 1mL をアプライし、1.5mL の PBS で溶出させた溶出液を BSA-SMCC 溶液とした ( $A_{280}$  測定から BSA 濃度を算出)。次に、0.5 mg の化合物 1 に 250mL PBS を加え、次いで 250mL DMF を加えて完全に溶解させた後、前述の BSA-SMCC 溶液 (BSA 換算 1.25mg) を攪拌下で添加して 3 時間ゆっくり攪拌した。反応液を PBS に対して 4℃、一晚透析し、最終濃度 0.05% となるようにアジ化ナトリウムを添加して、0.22  $\mu$ m フィルターでろ過した後 BSA-化合物 1 溶液とした。

96 ウェルの ELISA 用プレート (グライナー社製) に、上述のように調製したコンジュゲートを 0.05  $\mu$ g/mL、50  $\mu$ L/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を 100  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、形質転換株の培養上清を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 6000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG( $\gamma$ ) 抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50  $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、20 分後に 5%SDS 溶液を 50  $\mu$ L/ウェル加えて反応を停止した。その後 OD415 を測定した。実施例 4 の 1 項で得られた抗 CCR4 キメラ抗体は、CCR4 に対する結合活性を示した。

### 3. 抗 CCR4 キメラ抗体の精製

#### (1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

実施例 4 の 1 項 (1) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体を発現する形質転換細胞クローン KM2760#58-35-16 を 200nmol/L MTX、Daigo's GF21 (和光純薬製) を 5% の濃度で含む Hybridoma-SFM (インビトロジェン社製) 培地に  $2 \times 10^5$  細胞/mL となる様に懸濁し、スピナーボトル (岩城硝子社製) を用いて 37°C の恒温室内で Fed-Batch 攪拌培養した。8-10 日間培養して回収した培養上清より、Prosep-A (ミリポア社製) カラムおよびゲルろ過法を用いて、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。精製した抗 CCR4 キメラ抗体を KM2760-1 と名づけた。

#### (2) CHO/DG44 細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

実施例 4 の 1 項 (2) で得られた抗 CCR4 キメラ抗体を生産する形質転換細胞株 5-03 株を IMDM-dFBS(10) 培地中で、182cm<sup>2</sup> フラスコ (Greiner 社製) にて 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C にて培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、25mL の PBS バッファーにて細胞を洗浄後、EXCELL301 培地 (JRH 社製) を 35mL 注入した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C にて 7 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (ミリポア社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。精製した抗 CCR4 キメラ抗体は KM3060 と名付けた。

KM2760-1 および KM3060 の CCR4 に対する結合活性を実施例 4 の 2 項に記載の ELISA 法により測定した結果、同等の結合活性を示した。

### 4. 精製した抗 CCR4 キメラ抗体の解析

実施例 4 の 3 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 2 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の各 4  $\mu$ g を公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] に従って SDS-PAGE し、分子量および製精度を解析した。精製した各抗 CCR4 キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150Kd の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖および L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎖: 約 49Kd、L 鎖: 約 23Kd、分子全体: 約 144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報

告（アンティボディズ，Chapter 14、モノクローナル・アンティボディズ）と一致し、抗 CCR4 キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

5. 還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の調製

実施例 4 の 3 項で調製した YB2/0 細胞由来の抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760-1 と CHO/DG44 細胞由来の抗 CCR4 キメラ抗体 KM3060 の糖鎖分析を、実施例 3 の 1 項に記載の方法に従って行なった。還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、KM2760-1 は 87%、KM3060 は 8% であった。以下、これらの試料を、抗 CCR4 キメラ抗体（87%）、抗 CCR4 キメラ抗体（8%）と表記する。

さらに、抗 CCR4 キメラ抗体（87%）と抗 CCR4 キメラ抗体（8%）を用い、抗 CCR4 キメラ抗体（87%）：抗 CCR4 キメラ抗体（8%）＝1:39、16:67、22:57、32:47、42:37 の割合で混合した。これらの試料を実施例 3 の 1 項に記載の方法に従って糖鎖分析を行なった。還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、それぞれ 9%、18%、27%、39%、46% であった。以下、これらの試料を抗 CCR4 キメラ抗体（9%）、抗 CCR4 キメラ抗体（18%）、抗 CCR4 キメラ抗体（27%）、抗 CCR4 キメラ抗体（39%）、抗 CCR4 キメラ抗体（46%）と表記する。

第 8 図には、各試料の糖鎖分析の結果を示した。還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、2 回の結果を平均した値を用いた。

6. 抗体の CCR4 部分ペプチドに対する結合活性の評価（ELISA 法）

実施例 4 の 5 項で調製した還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる 6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の CCR4 部分ペプチドに対する結合活性は実施例 4 の 2 項に記載の方法に従って測定した。

その結果、第 9 図に示したように、6 種類の抗 CCR4 キメラ抗体は、いずれも同等の CCR4 に対する結合活性を示し、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位

にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、抗体の抗原結合活性に影響を与えないことが明らかとなった。

#### 7. ヒト CCR4 高発現細胞株に対する ADCC 活性の評価

抗 CCR4 キメラ抗体のヒト CCR4 高発現細胞に対する ADCC 活性は、以下のようにして測定した。

##### (1) 標的細胞溶液の調製

W001/64754 に記載のヒト CCR4 を高発現している CCR4/EL-4 細胞の  $1.5 \times 10^6$  細胞を調製し、放射性物質である  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  を 5.55MBq 当量加えて  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間 30 分間反応させ、細胞を放射性物質標識した。反応後、培地を用いた懸濁および遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、 $4^\circ\text{C}$  で 30 分間氷中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、培地を 7.5mL 加え、 $2 \times 10^5$  細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

##### (2) エフェクター細胞溶液の調製

健常人末梢血 60mL を採取し、ヘパリンナトリウム（清水製薬社製）を 0.6mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep（AXIS SHIELD 社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離（800g、20 分間）して単核球層を分離した。培地で 3 回遠心分離（1400rpm、5 分間）して洗浄後、培地を用いて  $5 \times 10^6$  細胞/mL の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

##### (3) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート（Falcon 社製）の各ウェルに上記（1）で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu\text{L}$ （ $1 \times 10^4$  細胞/ウェル）を分注した。次いで上記（2）で調製したエフェクター細胞溶液を  $100 \mu\text{L}$ （ $5 \times 10^5$  細胞/ウェル、ヒトエフェクター細胞と標的細胞の比は 50:1 となる）添加した。さらに、抗 CCR4 キメラ抗体を各最終濃度  $0.0001 \sim 10 \mu\text{g/mL}$  となるように加え、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、ヒトエフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離

$^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液とヒトエフェクター細胞溶液の代わりに 1mol/L の塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清中の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。ADCC 活性 (%) は前記式 (1) により求めた。

第 10 図および第 11 図には、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の各種濃度 (0.001~10  $\mu\text{g/mL}$ ) における ADCC 活性を 2 名の健常人ドナー (A, B) のエフェクター細胞を用いて測定した結果をそれぞれ示した。第 10 図および第 11 図に示したように、抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性はいずれの抗体濃度においても還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合に比例して上昇する傾向を示した。抗体濃度が低ければ、ADCC 活性は低下する。抗体濃度が 0.01  $\mu\text{g/mL}$  では、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖が 27%、39%および 46%の ADCC 活性はほぼ同様の高い活性を示したが、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖が 20%未満の抗体では、ADCC 活性は低かった。本結果は、エフェクター細胞のドナーが異なっても同様であった。

実施例 5. 宿主細胞株における  $\alpha$ 1,6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子の転写産物の定量

#### 1. 各種細胞株由来一本鎖 cDNA の調製

dhfr 遺伝子を欠損した CHO/DG44 細胞およびラットミエローマ YB2/0 細胞より、以下の手順で一本鎖 cDNA を調製した。

CHO/DG44 細胞を 10%FBS (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$  個/mL の密度で接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15mL 播種した。また、YB2/0 細胞を 10% FBS (Life Technologies 社製)、4mmol/L L-Gln (Life Technologies 社製) を添加した RPMI1640 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$  個/mL の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15mL 播種した。これらを 37°C の 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で培養し、培養 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目および 5 日目に各宿主細胞  $1 \times 10^7$  個を回収後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。



全 RNA を 45  $\mu$ L の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製) 1  $\mu$ L、付属の 10 $\times$ DNase buffer 5  $\mu$ L、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) 0.5  $\mu$ L をそれぞれに添加して、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、50  $\mu$ L の滅菌水に溶解した。

得られた各々の全 RNA 3  $\mu$ g に対し、SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20  $\mu$ L の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。各宿主細胞由来 FUT8、 $\beta$ -アクチンのクローニングには該反応液の 1 倍濃度液を、競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量には該反応液の 50 倍希釈水溶液を用い、各々使用するまで -80 $^{\circ}$ C で保管した。

## 2. チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片の取得

チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片の取得は、以下の手順で行った (第 12 図)。

まず、ヒト FUT8 の cDNA [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (J. Biochem.), 121, 626, (1997)] およびブタ FUT8 の cDNA [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 271, 27810, (1996)] に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー (配列番号 4 および配列番号 5 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、実施例 5 の 1 項で調製した培養 2 日目の CHO/DG44 細胞由来 cDNA および YB2/0 細胞由来 cDNA を各々 1  $\mu$ L を含む 25  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$ mol/L 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 4 および配列番号 5)] を調製し、ポリメラーゼ連鎖反応 (以下、PCR と表記する) を行った。PCR は、94 $^{\circ}$ C で 1 分間の加熱の後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、55 $^{\circ}$ C で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 979bp を GENECLAN Spin Kit (BIO 101 社製) を用いて精製し、滅菌水 10  $\mu$ L で溶出した (以下、アガロースゲルからの DNA 断片の精製にはこの方法を用いた)。上記増幅断片 4  $\mu$ L を、TOPO TA cloning Kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プ

ラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 XL1-Blue 株をコーエンらの方法 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69, 2110 (1972)] (以下、大腸菌の形質転換にはこの方法を用いた) により形質転換した。得られたカナマイシン耐性コロニーのうち cDNA が組み込まれた 6 クローンから、公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 7, 1513 (1979)] (以下、プラスミドの単離方法にはこの方法を用いた) に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を添付マニュアルに従い使用して決定した。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA がチャイニーズハムスター FUT8 およびラット FUT8 (配列番号 6 および 7 に示す) のオープンリーディングフレーム (以下、ORF と表記する) 部分配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、各プラスミドを CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 と称す。

### 3. チャイニーズハムスター $\beta$ -アクチンおよびラット $\beta$ -アクチン cDNA の取得

チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの取得は、以下の手順で行った (第 13 図)。

まず、チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンゲノム配列 (GenBank, U20114) およびラット  $\beta$ -アクチンゲノム配列 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 11, 1759 (1983)] より、翻訳開始コドンを含む共通配列に特異的なフォワードプライマー (配列番号 8 に示す) および翻訳終止コドンを含む各配列特異的なリバースプライマー (配列番号 9 および配列番号 10 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ KOD (東洋紡績社製) を用いて、実施例 5 の 1 項 で調製した培養 2 日目の CHO/DG44 細胞由来 cDNA および YB2/0 細胞由来 cDNA 1  $\mu$ L を含む 25  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の KOD buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mmol/L dNTPs、1mmol/L  $MgCl_2$ 、0.4  $\mu$ mol/L 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 8 および 9、または配列番号 8 および 10)、5% DMSO] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°C で 4 分間の加熱の後、98°C で 15 秒間、65°C で 2 秒間、74°C で 30 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。

PCR 後、反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 1128bp を精製した。この DNA 断片に対し、MEGALABEL (宝酒造社製) を用いて、添付の説明書に従い 5' 末端のリン酸化を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、滅菌水 10  $\mu$ L に溶解した。

一方、プラスミド pBluescriptII KS(+) 3  $\mu$ g (Stratagene 社製) を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 35  $\mu$ L に溶解し、16 単位の制限酵素 EcoRV (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。該反応液に pH8.0 の 1mol/L Tris-HCl 緩衝液 35  $\mu$ L および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) 3.5  $\mu$ L を添加して 65°C で 30 分間反応させることにより、DNA 末端の脱リン酸化を行った。この反応液に対しフェノール/クロロホルム抽出処理の後、エタノール沈殿法を行い回収した DNA 断片を滅菌水 100  $\mu$ L に溶解した。

上記で得たチャイニーズハムスター cDNA 由来増幅断片およびラット cDNA 由来増幅断片 (1192bp) 4  $\mu$ L、プラスミド pBluescriptII KS(+) 由来の EcoRV-EcoRV 断片 (約 3.0Kb) 1  $\mu$ L、Ligation High (東洋紡績社製) 5  $\mu$ L を混合し、16°C で 30 分間反応させることにより連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 XL1-Blue 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を添付マニュアルに従い使用して決定した。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン各 cDNA の ORF 全長配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、各プラスミドを CHAc-pBS および YBac-pBS と称す。

#### 4. FUT8 スタンダードおよび内部コントロールの調製

各細胞内の FUT8 遺伝子由来 mRNA 転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、実施例 5 の 2 項で得たチャイニーズハムスター FUT8 およびラット FUT8 の各 cDNA 部分断片を pCR2.1 に組み込んだプラスミドである CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 を制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。FUT8 定量の内部コントロールとしては、CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 のうち、チャイニーズハムスター FUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列の ScaI-

HindIII 間 203bp を欠失させることにより得られた CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 を、制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。以下にその詳細を説明する。

チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 のスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミド CHFT8-pCR2.1 の  $2\mu\text{g}$  を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製)  $40\mu\text{L}$  に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBFT8-pCR2.1 の  $2\mu\text{g}$  を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製)  $40\mu\text{L}$  に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 各 cDNA 部分断片を含む EcoRI-EcoRI 断片 (約 1Kb) がプラスミド CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 より分離されたことを確認した。各反応液より、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$  パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて  $0.02\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $0.2\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $1\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $2\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $10\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $20\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $100\text{fg}/\mu\text{L}$  の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 のスタンダードとした。

チャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部コントロールの調製は次のように行った (第 14 図)。DNA ポリメラーゼ KOD (東洋紡績社製) を用いて、CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 の 5ng を含む  $25\mu\text{L}$  の反応液 [1 倍濃度の KOD buffer #1 (東洋紡績社製)、 $0.2\text{mmol/L}$  dNTPs、 $1\text{mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $0.4\mu\text{mol/L}$  遺伝子特異的プライマー (配列番号 11 および 12)、5% DMSO] を調製し、PCR を行った。PCR は、 $94^\circ\text{C}$  で 4 分間の加熱の後、 $98^\circ\text{C}$  で 15 秒間、 $65^\circ\text{C}$  で 2 秒間、 $74^\circ\text{C}$  で 30 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、25 サイクル行った。PCR 後、反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 4.7Kb を精製した。該 DNA 断片に対し、MEGALABEL (宝酒造社製) を用いて、添付の説明書に従い 5' 末端のリン酸化を行った後、反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、滅菌水  $50\mu\text{L}$  に溶解した。上記で得た DNA 断片 (約 4.7Kb)  $5\mu\text{L}$  および Ligation High (東洋紡績社製)  $5\mu\text{L}$  を混合し、 $16^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させることにより自己環状化反応を行った。

該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。各プラスミド DNA に対し DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye

Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列 ScaI-HindIII 間 203bp が欠失したことを確認した。得られた各プラスミドを CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 と称す。

次にプラスミド CHFT8d-pCR2.1 の 2  $\mu$ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ L に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBFT8d-pCR2.1 の 2  $\mu$ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ L に溶解し、24 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター FUT8 およびラット FUT8 部分断片の内部塩基配列 203bp が欠失した断片を含む EcoRI-EcoRI 断片 (約 800bp) がプラスミド CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 より分離されたことを確認した。各反応液より、1  $\mu$ g/mL パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて 2fg/ $\mu$ L の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスターFUT8 およびラット FUT8 の内部コントロールとした。

#### 5. $\beta$ -アクチンスタンダードおよび内部コントロールの調製

各宿主細胞内の  $\beta$ -アクチン遺伝子由来 mRNA 転写量を測定するために、検量線に用いるスタンダードとして、実施例 5 の 3 項で得たチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン各 cDNA の ORF 全長を pBluescriptII KS(+) に組み込んだプラスミドである CHAc-pBS および YBAc-pBS を、前者は制限酵素 HindIII および PstI で、後者は制限酵素 HindIII および KpnI で、各々切断し直鎖化した DNA を用いた。 $\beta$ -アクチン定量の内部コントロールとしては、CHAc-pBS および YBAc-pBS のうち、チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部塩基配列の DraIII-DraIII 間 180bp を欠失させることにより得られた CHAc-d-pBS および YBAc-d-pBS を、前者は制限酵素 HindIII および PstI で、後者は制限酵素 HindIII および KpnI で、切断し直鎖化した DNA を用いた。以下にその詳細を説明する。

チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンのスタンダードの調製は次の手順で行った。プラスミド CHAc-pBS の 2  $\mu$ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ L に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 20 単位の PstI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行っ

た。一方、プラスミド YBac-pBS の  $2\mu\text{g}$  を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製)  $40\mu\text{L}$  に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 24 単位の KpnI (宝酒造社製) を加えて  $37^{\circ}\text{C}$  で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン各 cDNA ORF 全長を含む HindIII-PstI 断片および HindIII-KpnI 断片 (約 1.2Kb) がプラスミド CHAc-pBS および YBac-pBS より分離されたことを確認した。各反応液より、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$  パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて  $2\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $1\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $200\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $100\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $20\text{fg}/\mu\text{L}$  の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンのスタンダードとした。

チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部コントロールの調製は次の手順で行った (第 15 図)。CHAc-pBS の  $2\mu\text{g}$  を  $100\text{ng}/\mu\text{L}$  BSA (New England Biolabs 社製) を含む NEBuffer 3 (New England Biolabs 社製)  $100\mu\text{L}$  に溶解し、10 単位の制限酵素 DraIII (New England Biolabs) を加えて  $37^{\circ}\text{C}$  で 3 時間消化反応を行った。該反応液よりエタノール沈殿法を用いて DNA 断片を回収し、DNA Blunting Kit (宝酒造社製) を用い、添付の説明書に従って DNA 末端の平滑化を行った後、反応液を 2 等分した。まず一方の反応液には、 $\text{pH}8.0$  の  $1\text{mol}/\text{L}$  Tris-HCl 緩衝液  $35\mu\text{L}$  および大腸菌 C15 株由来 Alkaline Phosphatase (宝酒造社製)  $3.5\mu\text{L}$  を添加し、 $65^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させることにより DNA 末端の脱リン酸化を行った。脱リン酸化処理、フェノール/クロロホルム抽出処理およびエタノール沈殿法を行い、回収した DNA 断片を滅菌水  $10\mu\text{L}$  に溶解した。残る他方の反応液は 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、チャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチン ORF 部分断片を含む約 1.1Kb の DNA 断片を精製した。

上記で得た脱リン酸化 DraIII-DraIII 断片  $0.5\mu\text{L}$ 、約 1.1Kb の DraIII-DraIII 断片  $4.5\mu\text{L}$ 、Ligation High (東洋紡績社製)  $5\mu\text{L}$  を混合し、 $16^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応させることにより連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。各プラスミド DNA に対し DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を用いて配列決定を行い、同プラスミドに挿入されたチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチン DraIII-DraIII 間 180bp が欠失したことを確認した。本プラスミドを CHAc-pBS と称す。

また、ラット  $\beta$ -アクチン DraIII-DraIII 間 180bp が欠失したプラスミドを CHAc-d-pBS と同様の工程を経て作製した。本プラスミドを YBAc-d-pBS と称す。

次にプラスミド CHAc-d-pBS の 2  $\mu$ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ L に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 20 単位の PstI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。一方、プラスミド YBAc-d-pBS 2  $\mu$ g を NEBuffer 2 (New England Biolabs 社製) 40  $\mu$ L に溶解し、25 単位の制限酵素 HindIII (宝酒造社製) および 24 単位の KpnI (宝酒造社製) を加えて 37°C で 3 時間消化反応を行った。該反応液の一部を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、上記制限酵素消化反応によりチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン各 cDNA ORF 全長の内部塩基配列 180bp が欠失した断片を含む HindIII-PstI 断片および HindIII-KpnI 断片 (約 1.0Kb) がプラスミド CHAc-d-pBS および YBAc-d-pBS より分離されたことを確認した。各反応液より、1  $\mu$ g/L パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いて 200fg/ $\mu$ L の希釈液を調製し、これらをチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部コントロールとした。

## 6. 競合的 PCR による転写量の定量

実施例 5 の 4 項で作製した FUT8 内部コントロール DNA および実施例 5 の 1 項で得た宿主細胞株由来 cDNA を鋳型として競合的 PCR を行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内の FUT8 の転写産物の定量値を算出した。一方、 $\beta$ -アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各宿主細胞株由来 cDNA 合成反応の効率の目安として、 $\beta$ -アクチン遺伝子の転写量を定量した。すなわち、実施例 5 の 5 項で作製した  $\beta$ -アクチン内部コントロール DNA および実施例 5 の 1 項で得た宿主細胞株由来 cDNA を鋳型として PCR を行い、各鋳型に由来する増幅産物量の相対値より、宿主細胞株内の  $\beta$ -アクチンの転写産物の定量値を算出した。以下にその詳細を説明する。

FUT8 の転写産物の定量は次の手順で行った。まず、実施例 5 の 2 項で得たチャイニーズハムスター FUT8 およびラット FUT8 ORF 部分配列の内部配列に対し、共通配列特異的なプライマーセット (配列番号 13 および 14 に示す) を設計した。

次に、実施例 5 の 1 項で得た各宿主細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5  $\mu$ L および内部コントロール用プラスミド 5  $\mu$ L (10fg) を含む総体積 20  $\mu$ L の反応液

[1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$ mol/L 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 13 および 14)、5%DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 1 分間、60°C で 1 分間、72°C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 32 サイクル行った。

また、各宿主細胞株由来 cDNA に代えて、実施例 5 の 4 項で得た FUT8 スタンダードプラスミド 5  $\mu$ L (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系で PCR を行い、FUT8 転写量の検量線作成に用いた。

$\beta$ -アクチンの転写産物の定量は次の手順で行った。まず、実施例 5 の 3 項で得たチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチン ORF 全長の内部配列に対し、各遺伝子特異的なプライマーセット (前者を配列番号 15 および配列番号 16 に、後者を配列番号 17 および配列番号 18 に示す) をそれぞれ設計した。

次に、実施例 5 の 1 項で得られた各宿主細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5  $\mu$ L および内部コントロール用プラスミド 5  $\mu$ L (1pg) を含む総体積 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$ mol/L 上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 15 および配列番号 16、または配列番号 17 および配列番号 18)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、65°C で 1 分間、72°C で 2 分間から成る反応を 1 サイクルとした 17 サイクルの条件で行った。

また、各宿主細胞株由来 cDNA に代えて、実施例 5 の 5 項で得た  $\beta$ -アクチンスタンダードプラスミド 5  $\mu$ L (10pg、5pg、1pg、500fg、100fg) を添加した系で PCR をそれぞれ行い、 $\beta$ -アクチン転写量の検量線作成に用いた。



第 1 表

ターゲット 遺伝子	*プライマーセット	PCR増幅産物のサイズ (bp)	
		ターゲット	コンペティター
FUT8	F : 5' -GTCCATGGTGATCCTGCAGTGTGG-3' R : 5' -CACCAATGATATCTCCAGGTTCC-3'	638	431
$\beta$ -actin (チャイニーズハムスター)	F : 5' -GATATCGCTGCGCTCGTTGTGCGAC-3' R : 5' -CAGGAAGGAAGGCTGGAAAAGAGC-3'	789	609
$\beta$ -actin (ラット)	F : 5' -GATATCGCTGCGCTCGTCGTCGAC-3' R : 5' -CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGAGC-3'	789	609

\*F : フォワードプライマー、R : リバースプライマー

第 1 表に記載のプライマーセットを用いた PCR により、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第 1 表のターゲット欄に示したサイズの DNA 断片を、各内部コントロールから第 1 表のコンペティター欄に示したサイズの DNA 断片を増幅させることができる。

PCR 後の溶液のうち、7  $\mu$ L を 1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを 1 倍濃度の SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes 社製) に 30 分間浸漬し染色した。増幅された各 DNA 断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics 社製) で算出することにより、増幅された DNA 断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型とした PCR によって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各発現株由来全 cDNA を鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子 cDNA 量を算出し、これを各株における mRNA 転写量とした。

ラット FUT8 配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合の各宿主細胞株における FUT8 転写産物の量を第 16 図に示した。培養期間を通じて CHO/DG44 細胞株は YB2/0 細胞株の 10 倍以上の転写量を示した。この傾向は、チャイニーズハムスターFUT8 配列をスタンダード、内部コントロールに用いた場合にも認められた。

また、第 2 表に  $\beta$ -アクチン転写産物の量との相対値として FUT8 転写量を示した。培養期間を通じて YB2/0 細胞株の FUT8 転写量が  $\beta$ -アクチンの 0.1%前後であるのに対し、CHO/DG44 細胞株は 0.5%~2%であった。

以上の結果より、YB2/0 細胞株の FUT8 転写産物量は CHO/DG44 細胞株のそれよりも有意に少ないことが示された。

第 2 表

細胞株	培養日数				
	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目
CHO	1.95	0.90	0.57	0.52	0.54
YB2/0	0.12	0.11	0.14	0.08	0.07

実施例 6. 抗 GD3 キメラ抗体生産細胞株における FUT8 遺伝子の転写物の定量

#### 1. 各種生産細胞株由来一本鎖 cDNA の調製

抗 GD3 キメラ抗体生産細胞 DCHI01-20 株および 61-33 株より、以下の手順で一本鎖 cDNA を調製した。DCHI01-20 株は、実施例 1 の 2 項 (2) 記載の CHO/DG44 細胞由来の形質転換クローンである。また 61-33 株は、YB2/0 由来の形質転換細胞クローン 7-9-51 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、FERM BP-6691) に対し無血清馴化を行った後、2 回の限界希釈法によるクローンを行って得たクローンである。

DCHI01-20 株を 3mmol/L L-Gln (Life Technologies 社製)、0.3% PLURONIC F-68 (Life Technologies 社製) および 0.5% 脂肪酸濃縮液 (Life Technologies 社製) を添加した EXCELL302 培地 (JRH BIOSCIENCES 社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$  個/mL の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15mL 播種した。また、61-33 株を 0.2% BSA を添加した Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$  個/mL の密度で浮遊細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15mL 播種した。これらを 37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し、培養 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目および 5 日目に各宿主細胞  $1 \times 10^7$  個を回収し、RNAeasy (QIAGEN 社製) により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。

全 RNA を 45  $\mu$ L の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製) 1  $\mu$ L、付属の 10 $\times$ DNase buffer 5  $\mu$ L、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) 0.5  $\mu$ L をそれぞれに添加して、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、50  $\mu$ L の滅菌水に溶解した。

得られた全 RNA 3  $\mu$ g に対し、SUPERScript<sup>TM</sup>Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20  $\mu$ L の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。該反応液を水で 50 倍希釈し、使用するまで -80 $^{\circ}$ C で保管した。

## 2. 競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量

実施例 6 の 1 項で得た抗体生産細胞株由来 cDNA に対し、実施例 5 の 6 項に準じて競合的 PCR による各遺伝子転写量の定量を行った。

各生産細胞株内の FUT8 遺伝子由来の mRNA 転写量の定量は、以下の手順で行った。

FUT8 転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 5 の 2 項で得たチャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 の cDNA 部分断片を pCR2.1 に組み込んだプラスミドである CHFT8-pCR2.1 および YBFT8-pCR2.1 を制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

FUT8 定量の内部コントロールとしては、実施例 5 の 4 項で調製した CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 のうち、チャイニーズハムスター-FUT8 およびラット FUT8 の内部塩基配列の ScaI-HindIII 間 203bp を欠失させることにより得られた CHFT8d-pCR2.1 および YBFT8d-pCR2.1 を、制限酵素 EcoRI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

実施例 6 の 1 項で得た各生産細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5  $\mu$ L および内部コントロール用プラスミド 5  $\mu$ L (10fg) を含む総体積 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$ mol/L FUT8 遺伝子特異的プライマー (配列番号 13 および 14)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94 $^{\circ}$ C で 3 分間の加熱の後、94 $^{\circ}$ C で 1 分間、60 $^{\circ}$ C で 1 分間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間からなる反応を 1 サイクルとして 32 サイクル行った。

また、各生産細胞株由来 cDNA に代えて、FUT8 スタンダードプラスミド 5  $\mu$  L (0.1fg、1fg、5fg、10fg、50fg、100fg、500fg、1pg) を添加した系で PCR を行い、FUT8 転写量の検量線作成に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には 1  $\mu$  g/mL パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いた。

一方、 $\beta$ -アクチン遺伝子は各細胞において恒常的に転写されており、その転写量は細胞間で同程度と考えられているため、各生産細胞株由来 cDNA 合成反応の効率の目安として、 $\beta$ -アクチン遺伝子の転写量を以下の手順で定量した。

$\beta$ -アクチン遺伝子転写量の定量の際に検量線に用いるスタンダードとして、実施例 5 の 3 項で調製したチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの cDNA の ORF 全長を pBluescriptII KS(+) に組み込んだプラスミドである CHAc-pBS および YBAc-pBS を制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

$\beta$ -アクチン定量の内部コントロールとしては、実施例 5 の 5 項で調製した、CHAc-pBS および YBAc-pBS のうちチャイニーズハムスター  $\beta$ -アクチンおよびラット  $\beta$ -アクチンの内部塩基配列の DraIII-DraIII 間 180bp を欠失させることにより得られた CHAc-d-pBS および YBAc-d-pBS を、制限酵素 HindIII および KpnI で切断し直鎖化した DNA を用いた。

上記で得た各生産細胞株由来の cDNA 溶液の 50 倍希釈液 5  $\mu$  L および内部コントロール用プラスミド 5  $\mu$  L (1pg) を含む総体積 20  $\mu$  L の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$  mol/L  $\beta$ -アクチン特異的プライマー (配列番号 17 および 18)、5% DMSO] で、DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて PCR を行った。PCR は、94°C で 3 分間の加熱の後、94°C で 30 秒間、65°C で 1 分間、72°C で 2 分間から成る反応を 1 サイクルとした 17 サイクルの条件で行った。また、各生産細胞株由来 cDNA に代えて、 $\beta$ -アクチンスタンダードプラスミド 10pg、5pg、1pg、500fg、100fg を添加した系で PCR をそれぞれ行い、 $\beta$ -アクチン転写量の検量線作成に用いた。尚、スタンダードプラスミドの希釈には 1  $\mu$  g/mL パン酵母由来 t-RNA (SIGMA 社製) を用いた。

第 1 表に記載のプライマーセットを用いた PCR により、各遺伝子転写産物および各スタンダードから第 1 表のターゲット欄に示したサイズの DNA 断片を、各内部コントロールから第 1 表のコンペティター欄に示したサイズの DNA 断片を増幅させることができる。

PCR 後の溶液のうち、7  $\mu$ L を 1.75%アガロースゲル電気泳動に供した後、ゲルを 1 倍濃度の SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Molecular Probes 社製) に 30 分間浸漬し染色した。増幅された各 DNA 断片の発光強度をフルオロイメジャー (FluorImager SI; Molecular Dynamics 社製) で算出することにより、増幅された DNA 断片の量を測定した。

上記の方法により、スタンダードプラスミドを鋳型とした PCR によって生じた増幅産物量を測定し、その測定値とスタンダードプラスミド量をプロットして検量線を作成した。この検量線を用いて、各生産細胞株由来全 cDNA を鋳型とした場合の増幅産物の量より各株中の目的遺伝子 cDNA 量を算出し、これを各株における mRNA 転写量とした。

第 3 表に  $\beta$ -アクチン転写産物の量との相対値として FUT8 転写量を示した。培養期間を通じて、YB2/0 細胞由来抗体生産株 61-33 株の FUT8 転写量が  $\beta$ -アクチンの 0.3%以下であるのに対し、CHO 細胞由来抗体生産株 DCHI01-20 株は 0.7~1.5%であった。この結果より、YB2/0 細胞由来抗体生産株の FUT8 転写産物量は CHO 細胞由来抗体生産株のそれよりも有意に少ないことが示された。

第 3 表

細胞株	培養日数				
	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目
DCHI01-20	0.75	0.73	0.99	1.31	1.36
61-33	0.16	0.19	0.24	0.30	<0.10

#### 実施例 7. レクチン耐性 CHO/DG44 細胞の作製と該細胞を用いた抗体の生産

##### 1. レクチン耐性 CHO/DG44 株の取得

CHO/DG44 細胞を、IMDM-FBS(10)-HT(1)培地 [FBS を 10%、HT supplement (GIBCO BRL 社製) を 1 倍濃度含む IMDM 培地] にて接着培養用フラスコ 75cm<sup>2</sup> (グライナー社製) 中で培養し、コンフルエント直前まで増殖させた。5mL の PBS (インビトロジェン社製) にて細胞を洗浄後、PBS で希釈した 0.05%トリプシン (インビトロジェン社製) を 1.5mL 添加して 37°Cにて 5 分間放置し、細胞を培養器底面から剥離させた。剥離させた細胞を通常の細胞培養で行われる遠心操作により回収し、1 (10<sup>5</sup>細胞/mL の密度になるように IMDM-FBS(10)-HT(1)培地を添加して懸

濁後、未添加または  $0.1 \mu\text{g/mL}$  のアルキル化剤である N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (以下、MNNG と表記、Sigma 社製) を添加した。CO<sub>2</sub> インキュベータ (TABAI 製) 内で 37°C にて 3 日間放置後、培養上清を除き、再び上述した操作と同様の操作で細胞を洗浄、剥離、回収し、IMDM-FBS(10)-HT(1) 培地に懸濁後、接着培養用 96 ウェルプレート (岩城硝子社製) に  $1 \times 10^3$  細胞/ウェルの密度で播種した。各ウェルには培地中終濃度で  $1\text{mg/mL}$  のレンズマメ凝集素 (Lens culinaris agglutinin; 以下、LCA と表記、Vector 社製)、あるいは  $1\text{mg/mL}$  のヒイロチャワンタケ凝集素 (Aleuria aurantia Lectin; 以下、AAL と表記、Vector 社製)、あるいは  $1\text{mg/mL}$  のインゲンマメ凝集素 (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin; 以下、L-PHA と表記、Vector 社製) を添加した。CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 37°C にて 2 週間培養後、出現したコロニーをレクチン耐性 CHO/DG44 株として取得した。取得したそれぞれのレクチン耐性 CHO/DG44 株については、LCA 耐性株を CHO-LCA 株、AAL 耐性株を CHO-AAL 株、L-PHA 耐性株を CHO-PHA 株と名付けた。取得したこれら株の各種レクチンに対する耐性を調べたところ、CHO-LCA 株は AAL に対しても耐性であり、CHO-AAL 株は LCA に対しても耐性であることが分かった。さらに、CHO-LCA 株および CHO-AAL 株は、LCA や AAL が認識する糖鎖構造と同じ糖鎖構造を認識するレクチン、すなわち、N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミン残基の 1 位とフコースの 6 位が  $\alpha$  結合で付加された糖鎖構造を認識するレクチンに対しても耐性を示した。具体的には、終濃度  $1\text{mg/mL}$  のエンドウマメ凝集素 (Pisum sativum Agglutinin; 以下、PSA と表記、Vector 社製) が添加された培地でも CHO-LCA 株および CHO-AAL 株は耐性を示し生存することが分かった。また、アルキル化剤 MNNG 無添加の場合でも、上述の処理を施す細胞数を増やすことでレクチン耐性株を取得することが可能であった。以後、これら株を解析に用いた。

## 2. 抗 CCR4 キメラ抗体生産細胞の作製

実施例 7 の 1 項で得られた 3 種類のレクチン耐性株に、実施例 4 に記載した方法で、抗 CCR4 キメラ抗体発現プラスミド pKANTEX2160 を導入し、薬剤 MTX による遺伝子増幅を行い、抗 CCR4 キメラ抗体生産株を作製した。抗体発現量の測定は実施例 4 の 2 項に記載した ELISA 法を用いて行い、CHO-LCA 株、CHO-AAL 株、CHO-PHA 株、それぞれから抗体を発現した形質転換株を取得した。取得したそれぞれの形質転換株については、CHO-LCA 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-LCA 株、CHO-

AAL 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-AAL 株、CHO-PHA 株由来の形質転換株を CHO/CCR4-PHA 株と名付けた。なお CHO/CCR4-LCA 株は Nega-13 の株名で、平成 13 年 9 月 26 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6）に FERM BP-7756 として寄託されている。

### 3. レクチン耐性 CHO 細胞による高 ADCC 活性抗体の生産

実施例 7 の 2 項で得られた 3 種類の形質転換株を用い、実施例 4 の 3 項に記載した方法で精製抗体を取得した。精製した抗 CCR4 キメラ抗体の抗原結合活性は実施例 4 の 2 項に記載した ELISA 法を用いて評価した。いずれの形質転換株が生産する抗体も、実施例 4 で作製した通常の CHO/DG44 細胞を宿主とした生産株 5-03 株が生産する抗体と同等の抗原結合活性を示した。それら精製抗体を用い、実施例 4 の 7 項に記載した方法に従って各抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を評価した。その結果を第 17 図に示した。5-03 株が生産した抗体と比較して、CHO/CCR4-LCA 株および CHO/CCR4-AAL 株が生産した抗体では、約 100 倍程度の ADCC 活性の上昇が観察された。一方、CHO/CCR4-PHA 株が生産した抗体では有意な ADCC 活性の上昇は観察されなかった。また、CHO/CCR4-LCA 株と YB2/0 細胞由来の生産株が生産した抗体の ADCC 活性を実施例 4 の 7 項に記載した方法に従って比較したところ、CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体は実施例 4 の 1 項で作製した YB2/0 細胞由来生産株が生産した抗体 KM2760-1 と同様の高い ADCC 活性を示すことが明らかとなった（第 18 図）。

### 4. レクチン耐性 CHO 細胞が生産する抗体の糖鎖分析

実施例 7 の 3 項で精製した抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖分析を実施例 3 の 1 項に記載の方法に従って行った。第 19 図に各種抗 CCR4 キメラ抗体の精製 PA 化糖鎖群の溶離図を示した。

第 4 表には、各種レクチン耐性株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖分析の結果得られた還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合（%）を示す。

第 4 表

抗体生産細胞	$\alpha$ 1, 6-フコースを持たない糖鎖の割合 (%)
5-03 株	9
CHO/CCR4-LCA 株	48
CHO/CCR4-AAL 株	27
CHO/CCR4-PHA 株	8

5-03 株が生産した抗体と比較して、CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗体では、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が、9%から 48%まで上昇していた。CHO/CCR4-AAL 株が生産した抗体では、 $\alpha$  1, 6-フコースを持たない糖鎖の割合が、9%から 27%まで上昇していた。一方、CHO/CCR4-PHA 株では 5-03 株と比較して、糖鎖パターンおよび  $\alpha$  1, 6-フコースを持たない糖鎖の割合に殆ど変化は認められなかった。

#### 実施例 8. レクチン耐性 CHO 細胞株の解析

##### 1. 抗 CCR4 キメラ抗体生産 CHO/CCR4-LCA 株における GMD 酵素の発現量解析

実施例 7 で取得した抗 CCR4 キメラ抗体生産 CHO/CCR4-LCA 株における、フコース合成酵素として知られる GMD、GFPP、FX、およびフコース転移酵素である FUT8 の各遺伝子の発現量を、RT-PCR 法を用いて解析した。

##### (1) 各種細胞株からの RNA 調製

CHO/DG44 細胞、実施例 4 の 1 項 (2) で取得した抗 CCR4 キメラ抗体生産細胞株 5-03 株、実施例 7 の 2 項で取得した抗 CCR4 キメラ抗体生産細胞株 CHO/CCR4-LCA 株をそれぞれ 37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて継代後 4 日間培養した。培養後、RNeasy Protect Mini kit (キアゲン社製) を用いて、各  $1 \times 10^7$  細胞より添付の使用説明書に従って RNA を調製した。続いて、SUPER SCRIPT First-Strand synthesis system for RT-PCR (GIBCO BRL 社製) を用い、添付の使用説明書に従って各 RNA 5  $\mu$ g より 20  $\mu$ L の反応液中にて一本鎖 cDNA を合成した。

##### (2) RT-PCR 法を用いた GMD 遺伝子の発現量解析

GMD cDNA を PCR 法によって増幅するために、参考例 2 の 1 項で示す CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より、配列番号 32 で示される塩基配列を有する 24mer の合成



DNA プライマーと配列番号 33 で示される塩基配列を有する 26mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、実施例 8 の 1 項(1)で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 32 と 33 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°C にて 5 分間加熱した後 94°C にて 1 分間、68°C にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10  $\mu$ L をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 350bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

### (3) RT-PCR 法を用いた GFPP 遺伝子の発現量解析

GFPP cDNA を PCR 法によって増幅するために、参考例 1 の 2 項で取得した CHO 細胞由来 GFPP の cDNA 配列に基づいて、配列番号 34 で示される塩基配列を有する 27mer の合成 DNA プライマーと配列番号 35 で示される塩基配列を有する 23mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、実施例 8 の 1 項(1)で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 34 と 35 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°C にて 5 分間加熱した後 94°C にて 1 分間、68°C にて 2 分間のサイクルを 24 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10  $\mu$ L をアガロース電気泳動した後、サイバーグリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 600bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

### (4) RT-PCR 法を用いた FX 遺伝子の発現量解析

FX cDNA を PCR 法によって増幅するために、参考例 1 の 1 項で取得した CHO 細胞由来 FX の cDNA 配列に基づいて、配列番号 36 で示される塩基配列を有する 28mer の合成 DNA プライマーと配列番号 37 で示される塩基配列を有する 28mer の合成 DNA プライマーを作製した。

続いて、実施例 8 の 1 項(1)で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 36 と 37 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 22 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10  $\mu$ L をアガロース電気泳動した後、サイバークリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 300bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

#### (5) RT-PCR 法を用いた FUT8 遺伝子の発現量解析

FUT8 cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 8 の 1 項(1)で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 13 と 14 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 20 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10  $\mu$ L をアガロース電気泳動した後、サイバークリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 600bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

#### (6) RT-PCR 法を用いた $\beta$ -アクチン遺伝子の発現量解析

$\beta$ -アクチン cDNA を PCR 法によって増幅するために、実施例 8 の 1 項(1)で作製した各細胞株由来の一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 15 と 16 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 14 サイクル行なった。上記の該 PCR 反応液 10  $\mu$ L をアガロース電気泳動した後、サイバークリーン (BMA 社製) を用いて DNA 断片を染色し、予想される約 800bp の DNA 断片量を Fluor Imager SI (モレキュラーダイナミクス社製) を用いて測定した。

## (7) 各細胞株における GMD、GFPP、FX、FUT8 遺伝子の発現量

実施例 8 の 1 項(2)から(6)で測定した各細胞株における GMD、GFPP、FX、FUT8 cDNA 由来 PCR 増幅断片量の値を、各細胞株における  $\beta$ -アクチンの cDNA 由来 PCR 増幅断片量の値で割り、CHO/DG44 細胞における PCR 増幅断片量を 1 とした場合の 5-03 株および CHO/CCR4-LCA 株における各遺伝子の PCR 増幅断片量を求めた。結果を第 5 表に示す。

第 5 表

	GMD	GFPP	FX	FUT8
CHO/DG44 株	1	1	1	1
CHO/DG44 株 抗 CCR4 抗体生産細胞 5-03 株	1.107	0.793	1.093	0.901
5-03 株由来 LCA 耐性細胞 CHO/CCR4-LCA	0.160	0.886	0.920	0.875

第 5 表で示したように CHO/CCR4-LCA 株の GMD 遺伝子の発現量が他の細胞株と比べ 1/10 程度に低下していた。なお、本実験は独立して 2 回行い、その平均値を使用した。

## 2. GMD 遺伝子を強制発現させた抗 CCR4 キメラ抗体生産 CHO/CCR4-LCA 株を用いた解析

### (1) CHO 細胞由来 GMD 遺伝子発現ベクター pAGE249GMD の構築

参考例 2 の 1 項で取得した CHO 細胞由来 GMD の cDNA 配列に基づいて、配列番号 38 で示される塩基配列を有する 28mer のプライマー、および配列番号 39 で示される塩基配列を有する 29mer のプライマーを作製した。続いて、実施例 8 の 1 項(1)で作製した CHO 細胞由来一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 38 と 39 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用い

て、94℃にて 5 分間加熱した後 94℃にて 1 分間、58℃にて 1 分間、72℃にて 1 分間のサイクルを 8 サイクル反復した後、さらに 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 22 サイクル反復した。反応終了後、該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 600bp の DNA 断片を回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド mt-C を得た (第 20 図)。

次に、参考例 2 の 1 項で取得した CHO 細胞由来 GMD の cDNA 配列に基づいて、配列番号 40 で示される塩基配列を有する 45mer のプライマー、および配列番号 41 で示される塩基配列を有する 31mer のプライマーを作製した。続いて、実施例 8 の 1 項(1) で作製した CHO 細胞由来一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 40 と 41 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後 94℃にて 1 分間、57℃にて 1 分間、72℃にて 1 分間のサイクルを 8 サイクル反復した後、さらに 94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 22 サイクル反復した。反応終了後、該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 150p の DNA 断片を回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド ATG を得た (第 21 図)。

次に、参考例 2 の 1 項に記載のプラスミド CHO-GMD の 3  $\mu$ g を制限酵素 SacI (宝酒造社製) で 37℃にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画後、約 900bp の DNA 断片を回収した。上記で得られたプラスミド mt-C の 1.4  $\mu$ g を制限酵素 SacI (宝酒造社製) で 37℃にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で 37℃にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 3.1kbp の DNA 断片を回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、プラスミド WT-N(-) を得た (第 22 図)。

次に、プラスミド WT-N(-) の  $2\mu\text{g}$  を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で  $37^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で  $37^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 1kbp の DNA 断片を回収した。プラスミド pBluescriptSK(-) (Stratagene 社製) の  $3\mu\text{g}$  を制限酵素 BamHI (宝酒造社製) で  $37^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で  $37^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 3kbp の DNA 断片を回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、プラスミド WT-N(-) in pBS を得た (第 23 図)。

次に、プラスミド WT-N(-) in pBS の  $2\mu\text{g}$  を制限酵素 HindIII (宝酒造社製) で  $37^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で  $37^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 4kbp の DNA 断片を回収した。上記で得られたプラスミド ATG の  $2\mu\text{g}$  を制限酵素 HindIII (宝酒造社製) で  $37^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間反応後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行なって DNA を回収し、制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で  $37^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 150bp の DNA 断片を回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、プラスミド WT in pBS を得た (第 24 図)。

次に、プラスミド pAGE249 の  $2\mu\text{g}$  を制限酵素 HindIII と BamHI (共に宝酒造社製) で  $37^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 6.5kbp の DNA 断片を回収した。プラスミド WT in pBS の  $2\mu\text{g}$  を制限酵素 HindIII と BamHI (共に宝酒造社製) で  $37^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 1.2kbp の DNA 断片を回収した。それぞれ回収した DNA 断片を DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、プラスミド pAGE249GMD を得た (第 25 図)。

## (2) CHO/CCR4-LCA 株における GMD 遺伝子の安定発現

制限酵素 FspI (NEW ENGLAND BIOLABS 社製) で切断することにより直鎖状とした CHO 細胞由来 GMD 遺伝子発現ベクター pAGE249GMD の  $5\mu\text{g}$ 、 $1.6 \times 10^6$  細胞の CHO/CCR4-LCA 株へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、MTX (SIGMA 社製) を  $200\text{nmol/L}$  の濃度で含む  $30\text{mL}$  の IMDM-dFBS (10) 培地 [10% dFBS を含む IMDM 培地 (GIBCO BRL 社製)] に懸濁し、 $182\text{cm}^2$  フラスコ (Greiner 社製) にて  $37^\circ\text{C}$  の 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 24 時間培養した。培養後、ハイグロマイシンを  $0.5\text{mg/mL}$ 、MTX (SIGMA 社製) を  $200\text{nmol/L}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10) 培地に培地交換してさらに 19 日間培養し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニー群を取得した。

また同様に、pAGE249 ベクターを上記と同じ方法で CHO/CCR4-LCA 株へ導入し、ハイグロマイシン耐性を示す形質転換株のコロニー群を取得した。

## (3) GMD 遺伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株の培養および抗体の精製

実施例 8 の 2 項(2)で取得した GMD を発現している形質転換細胞群を MTX (SIGMA 社製) を  $200\text{nmol/L}$ 、ハイグロマイシンを  $0.5\text{mg/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10) 培地を用いて、 $182\text{cm}^2$  フラスコ (Greiner 社製) にて  $37^\circ\text{C}$  の 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、 $25\text{mL}$  の PBS (GIBCO BRL 社製) にて細胞を洗浄後、EXCELL301 培地 (JRH 社製) を  $35\text{mL}$  注入した。 $37^\circ\text{C}$  の 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 7 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A (ミリポア社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 CCR4 キメラ抗体を精製した。

また同様に、pAGE249 ベクターを導入した形質転換細胞群を上記と同じ方法で培養後、培養上清より抗 CCR4 キメラ抗体を回収、精製した。

## (4) 形質転換細胞群におけるレクチン耐性度の測定

実施例 8 の 2 項(2)で取得した GMD 遺伝子を発現している形質転換細胞群を、MTX (SIGMA 社製) を  $200\text{nmol/L}$ 、ハイグロマイシンを  $0.5\text{mg/mL}$  の濃度で含む IMDM-dFBS (10) 培地に  $6 \times 10^4$  細胞/mL になるように懸濁し、96 ウェル培養用プレート (岩城硝子社製) に  $50\mu\text{L}$ /ウェルずつ分注した。続いて、このウェルに MTX (SIGMA 社製) を  $200\text{nmol/L}$ 、ハイグロマイシンを  $0.5\text{mg/mL}$  の濃度で含む

IMDM-dFBS(10) 培地に 0mg/mL、0.4mg/mL、1.6mg/mL、4mg/mL の濃度で LCA (LENS CULINARIS AGGLUTININ: Vector Laboratories 社製) を添加した培地を 50  $\mu$ L ずつ加え、37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 96 時間培養した。培養後、WST-1 (ベーリンガー社製) を 10  $\mu$ L/ウェルになるよう加え、37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分間放置して発色させたのち、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD 社製) にて 450nm と 595nm の吸光度 (以下 OD450、OD595 と表記する) を測定した。また同様に、pAGE249 ベクターを導入した形質転換細胞群も上記と同じ方法で測定した。以上の実験は独立して 2 回行なった。

上記で測定した OD450 から OD595 を引いた値を各細胞群の生存数とし、LCA を加えていないウェルの細胞生存数を 100%とした場合の各ウェルの細胞生存数を % で表記し第 26 図に示した。第 26 図に示したように、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株では LCA 耐性度の低下が観察され、0.2mg/mL の LCA 存在下での細胞生存率は約 40%、0.8mg/mL の LCA 存在下での細胞生存率は約 20%であった。一方、pAGE249 ベクターを導入した CHO/CCR4-LCA 株では、0.2mg/mL の LCA 存在下での細胞生存率は 100%、0.8mg/mL の LCA 存在下においても細胞生存率は約 80%であった。以上の結果より、CHO/CCR4-LCA 株は GMD 遺伝子の発現量が低下しており、その結果 LCA に対する耐性を獲得していることが示唆された。

#### (5) GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性

実施例 8 の 2 項(3)で得られた精製抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性を以下に示す方法に従い、測定した。

##### i) 標的細胞溶液の調製

W001/64754 に記載の CCR4/EL-4 細胞の  $1 \times 10^6$  細胞を調製し、放射性物質である Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> を 3.7MBq 当量加えて 37°C で 90 分間反応させ、細胞を放射線標識した。反応後、RPMI1640-FBS(10) 培地で懸濁および遠心分離操作により 3 回洗浄し、培地に再懸濁し、4°C で 30 分間水中に放置して放射性物質を自然解離させた。遠心分離後、RPMI1640-FBS(10) 培地を 5mL 加え、 $2.0 \times 10^5$  細胞/mL に調製し、標的細胞溶液とした。

## ii) エフェクター細胞溶液の調製

健康人静脈血 50mL を採取し、ヘパリンナトリウム（武田薬品社製）0.5mL を加え穏やかに混ぜた。これを Lymphoprep（Nycomed Pharma AS 社製）を用いて使用説明書に従い、遠心分離して単核球層を分離した。RPMI1640-FBS(10) 培地で 3 回遠心分離して洗浄後、培地を用いて  $2.5 \times 10^6$  細胞/mL の濃度で再懸濁し、エフェクター細胞溶液とした。

## iii) ADCC 活性の測定

96 ウェルU字底プレート（Falcon 社製）の各ウェルに上記 i) で調製した標的細胞溶液の  $50 \mu\text{L}$  ( $1 \times 10^4$  細胞/ウェル) を分注した。次いで ii) で調製したエフェクター細胞溶液を  $100 \mu\text{L}$  ( $2.5 \times 10^5$  細胞/ウェル、エフェクター細胞と標的細胞の比は 25:1 となる) 添加した。更に、各種抗 CCR4 キメラ抗体を最終濃度  $0.0025 \sim 2.5 \mu\text{g/mL}$  となるように加え、 $37^\circ\text{C}$  で 4 時間反応させた。反応後、プレートを遠心分離し、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を  $\gamma$ -カウンターにて測定した。自然解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、エフェクター細胞溶液、抗体溶液の代わりに培地のみを用いて上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。全解離  $^{51}\text{Cr}$  量は、抗体溶液の代わりに培地のみを、エフェクター細胞溶液の代わりに  $1\text{mol/L}$  の塩酸溶液を添加し、上記と同様の操作を行い、上清の  $^{51}\text{Cr}$  量を測定することにより求めた。ADCC 活性は前記式 (1) により求めた。

ADCC 活性測定の結果を第 27 図に示した。第 27 図に示したように、GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性は、実施例 4 で取得した通常の CHO 細胞由来の生産株が生産した KM3060 と同程度にまで低下していた。一方、pAGE249 ベクターを導入した CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体の ADCC 活性は、CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体と同程度の ADCC 活性を有していた。以上の結果より、CHO/CCR4-LCA 株は GMD 遺伝子の発現量が低下しており、その結果 ADCC 活性の高い抗体を生産出来ることが示唆された。

## (6) GMD を発現させた CHO/CCR4-LCA 株由来の抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖分析

実施例 8 の 2 項(3)で得られた精製抗 CCR4 キメラ抗体の糖鎖分析を実施例 3 の 1 項に示す方法に従って行ない、その解析結果を第 28 図に示した。実施例 7 で作製した CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体と比較して、GMD 遺



伝子を発現させた CHO/CCR4-LCA 株より取得した精製抗 CCR4 キメラ抗体では、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が 9%に低下していた。以上より、CHO/CCR4-LCA 株に GMD 遺伝子を発現させることによって、該細胞の生産する抗体の還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が 5-03 株の生産する抗体と同程度まで低下することが示された。

#### 実施例 9. 抗線維芽細胞増殖因子-8 ヒト型キメラ抗体の作製

##### 1. 抗線維芽細胞増殖因子-8 ヒト型キメラ抗体の安定生産細胞の作製

参考例 3 に記載の抗線維芽細胞増殖因子-8 (以下、FGF-8 と表記する) ヒト型キメラ抗体のタンデム型発現ベクター pKANTEX1334 を用いて抗 FGF-8 ヒト型キメラ抗体 (以下、抗 FGF-8 キメラ抗体と表記する) の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

##### (1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

抗 FGF-8 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX1334 の  $10\mu\text{g}$  を  $4 \times 10^6$  細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞 (ATCC CRL1662) へエレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40mL の Hybridoma-SFM-FBS(5) [FBS (PAA ラボラトリーズ社製) を 5%含む Hybridoma-SFM 培地 (インビトロジェン社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に  $200\mu\text{L}$ /ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 FGF-8 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 9 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 FGF-8 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/mL、DHFR の阻害剤である MTX (SIGMA 社製) を 50nmol/L 含む Hybridoma-SFM-FBS(5) 培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 1mL ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増

殖が認められたウェルの培養上清中の抗 FGF-8 キメラ抗体の抗原結合活性を実施例 9 の 2 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に抗 FGF-8 キメラ抗体の生産が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nmol/L の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS (5) 培地で増殖可能かつ、抗 FGF-8 キメラ抗体を高生産する形質転換株 5-D を得た。得られた形質転換株について、限界希釈法によるクローン化を行い、得られた形質転換細胞クローンを 5-D-10 と名付けた。

## (2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

実施例 4 に記載した方法に従い、抗 FGF-8 キメラ抗体発現プラスミド pKANTEX1334 を CHO/DG44 細胞に導入し、薬剤 MTX による遺伝子増幅を行い、抗 FGF-8 キメラ抗体を高生産する形質転換株を得た。抗体発現量の測定は実施例 9 の 2 項に記載した ELISA 法を用いて行いった。得られた形質転換株について、2 回の限界希釈法によるクローン化を行い、得られた形質転換細胞クローンを 7-D-1-5 と名付けた。

## 2. 抗体の FGF-8 部分ペプチドに対する結合活性 (ELISA 法)

抗 FGF-8 キメラ抗体が反応し得るヒト FGF-8 ペプチドとして化合物 2 (配列番号 21) を選択した。ELISA 法による活性測定に用いるため、以下の方法で BSA (ナカライテスク社製) とのコンジュゲートを作製し、抗原として用いた。すなわち、10 mg の BSA を含む PBS 溶液 900 mL に、100mL の 25mg/mL SMCC [4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシリクアシッド N-ヒドロキシサクシンイミドエステル] (シグマ社製)-DMSO 溶液を攪拌しながら滴下し、30 分間ゆっくりと攪拌した。25 mL の PBS で平衡化した NAP-10 カラムなどのゲルろ過カラムに反応液 1mL をアプライし、1.5mL の PBS で溶出させた溶出液を BSA-SMCC 溶液とした ( $A_{280}$  測定から BSA 濃度を算出)。次に、0.5 mg の化合物 2 に 250mL PBS を加え、次いで 250mL DMF を加えて完全に溶解させた後、前述の BSA-SMCC 溶液 (BSA 換算 1.25mg) を攪拌下で添加して 3 時間ゆっくり攪拌した。反応液を PBS に対して 4℃、一晚透析し、最終濃度 0.05% となるようにアジ化ナトリウムを添加して、0.22  $\mu$ m フィルターでろ過した後 BSA-化合物 2 溶液とした。

96 ウェルの ELISA 用プレート（グライナー社製）に、上述のように調製したコンジュゲートを  $1\mu\text{g/mL}$ 、 $50\mu\text{L}$ /ウェルで分注し、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を  $100\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、形質転換株の培養上清あるいは精製抗体を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG( $\gamma$ ) 抗体溶液（American Qualex 社製）を二次抗体溶液として、 $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、10 分後に 5%SDS 溶液を  $50\mu\text{L}$ /ウェル加えて反応を停止した。その後 OD415 を測定した。

### 3. 抗 FGF-8 キメラ抗体の精製

#### (1) YB2/0 細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

実施例 9 の 1 項 (1) で得られた抗 FGF-8 キメラ抗体を発現する形質転換株 5-D を  $200\text{nmol/L}$  MTX、Daigo's GF21（和光純薬製）を 5%の濃度で含む Hybridoma-SFM（インビトロジェン社製）培地中で、 $182\text{cm}^2$  フラスコ（Greiner 社製）にて 5% $\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^{\circ}\text{C}$ にて培養した。8-10 日間培養して回収した培養上清より、Prosep-A（ミリポア社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 FGF-8 キメラ抗体を精製した。精製した抗 FGF-8 キメラ抗体を YB2/0-FGF8 キメラ抗体と名付けた。

#### (2) CHO/DG44 細胞由来の生産細胞の培養および抗体の精製

実施例 9 の 1 項 (2) で得られた抗 FGF-8 キメラ抗体を生産する形質転換細胞クローン 7-D-1-5 を IMDM-dFBS(10) 培地中で、 $182\text{cm}^2$  フラスコ（Greiner 社製）にて 5% $\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^{\circ}\text{C}$ にて培養した。数日後、細胞密度がコンフルエントに達した時点で培養上清を除去し、25mL の PBS バッファーにて細胞を洗浄後、EXCELL301 培地（JRH 社製）を 35mL 注入した。5% $\text{CO}_2$  インキュベーター内で  $37^{\circ}\text{C}$ にて 7 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Prosep-A（ミリポア社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 FGF-8 キメラ抗体を精製した。精製した抗 FGF-8 キメラ抗体は CHO-FGF8 キメラ抗体と名付けた。

YB2/0-FGF8 キメラ抗体および CHO-FGF8 キメラ抗体の FGF-8 に対する結合活性を実施例 9 の 2 項に記載の ELISA 法により測定した結果、同等の結合活性を示した。

#### 4. 精製した抗 FGF-8 キメラ抗体の解析

実施例 9 の 3 項で得られた各種動物細胞で生産、精製した 2 種類の抗 FGF-8 キメラ抗体の各 4  $\mu$ g を公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)] に従って SDS-PAGE し、分子量および製精度を解析した。精製した各抗 FGF-8 キメラ抗体は、いずれも非還元条件下では分子量が約 150Kd の単一のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、抗体の H 鎖および L 鎖の cDNA の塩基配列から推定される分子量 (H 鎖: 約 49Kd、L 鎖: 約 23Kd、分子全体: 約 144Kd) とほぼ一致し、更に、IgG 型の抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告 (アンティボディズ, Chapter 14、モノクローナル・アンティボディズ) と一致し、抗 FGF-8 キメラ抗体が正しい構造の抗体分子として発現され、かつ精製されたことが確認された。

#### 5. 精製した抗 FGF-8 キメラ抗体の糖鎖分析

実施例 9 の 4 項で調製した YB2/0 細胞由来の抗 FGF-8 キメラ抗体である YB2/0-FGF8 キメラ抗体と CHO/DG44 細胞由来の抗 FGF-8 キメラ抗体である CHO-FGF8 キメラ抗体の糖鎖分析を、実施例 3 の 1 項に記載の方法に従って行なった。その結果、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は、YB2/0-FGF8 キメラ抗体は 58%、CHO-FGF8 キメラ抗体は 13%であった。以下、これらの試料を、抗 FGF-8 キメラ抗体 (58%)、抗 FGF-8 キメラ抗体 (13%) と表記する。

#### 実施例 10. 可溶性ヒト Fc $\gamma$ RIIIa 蛋白質の作製

##### 1. 可溶性ヒト Fc $\gamma$ RIIIa 蛋白質の発現ベクターの構築

##### (1) ヒト末梢血単核球 cDNA の作製

健常人の静脈血 30mL を採取し、ヘパリンナトリウム (清水製薬社製) 0.5mL を加えて穏やかに混和した後、生理的食塩水 (大塚製薬社製) 30mL と混合した。混

合後、各 10mL をそれぞれ Lymphoprep (NYCOMED PHARMA AS 社製) 4mL 上に穏やかに重層し、室温下 2000rpm で 30 分間の遠心分離を行った。分離された単核球画分を各遠心管より集めて混合し、RPMI1640-FBS(10) 30mL に懸濁した。室温下 1200rpm で 15 分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、該細胞を RPMI1640-FBS(10) 20mL に懸濁した。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、RPMI1640-FBS(10) を用いて  $2 \times 10^6$  個/mL の末梢血単核球懸濁液を調製した。

上記のようにして調製した末梢血単核球懸濁液の 5mL を室温下 800rpm で 5 分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、5mL の PBS に懸濁した。室温下 800rpm で 5 分間の遠心分離を行った後、上清を除去し、QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いて添付の説明書に従い、全 RNA を抽出した。

得られた全 RNA  $2 \mu\text{g}$  に対し、SUPERSRIPT™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした  $40 \mu\text{L}$  の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。

## (2) ヒト Fc $\gamma$ RIIIa 蛋白質をコードする cDNA の取得

ヒト Fc $\gamma$ RIIIa 蛋白質 (以下、hFc $\gamma$ RIIIa と表記する) の cDNA の取得は、以下のようにして行った。

まず、hFc $\gamma$ RIIIa の cDNA の塩基配列 [ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン (J. Exp. Med.), 170, 481 (1989)] より、翻訳開始コドンを含む特異的なフォワードプライマー (配列番号 22 に示す) および翻訳終止コドンを含む特異的なリバースプライマー (配列番号 26 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、実施例 10 の 1 項 (1) で調製したヒト末梢血単核球由来の cDNA 溶液の 20 倍希釈液  $5 \mu\text{L}$  を含む  $50 \mu\text{L}$  の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、 $1 \mu\text{mol/L}$  上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 22 および 26)] を調製し、PCR を行った。PCR は、 $94^\circ\text{C}$  で 30 秒間、 $56^\circ\text{C}$  で 30 秒間、 $72^\circ\text{C}$  で 60 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、35 サイクル行った。

PCR 後、反応液を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、滅菌水  $20 \mu\text{L}$  に溶解した。制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約 800bp を回収した。

一方、プラスミド pBluescriptII SK(-) 2.5  $\mu$ g (Stratagene 社製) を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約 2.9kbp の断片を回収した。

上記で得たヒト末梢血単核球 cDNA 由来増幅断片とプラスミド pBluescriptII SK (-)由来の断片を、DNA Ligation Kit Ver. 2.0 (宝酒造社製)を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を添付マニュアルに従い使用して決定した。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、hFc  $\gamma$  RIIIa の cDNA の ORF 全長配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、本プラスミドを pBSFc  $\gamma$  RIIIa5-3 と称す。

決定した hFc  $\gamma$  RIIIa の全長 cDNA 配列を配列番号 27、それに対応するアミノ酸配列を配列番号 28 に示す。

### (3) 可溶性 hFc $\gamma$ RIIIa をコードする cDNA の取得

hFc  $\gamma$  RIIIa の細胞外領域 (配列番号 28 の 1~193 番目) と C 末端に His-tag 配列を持つ可溶性 hFc  $\gamma$  RIIIa (以下、shFc  $\gamma$  RIIIa) をコードする cDNA は、以下のようにして構築した。

まず、hFc  $\gamma$  RIIIa の cDNA の塩基配列 (配列番号 27) より、細胞外領域に特異的なプライマー FcgR3-1 (配列番号 29 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、実施例 10 の 1 項 (2) で作製したプラスミド pBSFc  $\gamma$  RIIIa5-3 を 5ng を含む 50  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、1  $\mu$ mol/L プライマー FcgR3-1、1  $\mu$ mol/L プライマー M13M4 (宝酒造社製)] を調製し、PCR を行った。PCR は、94°C で 30 秒間、56°C で 30 秒間、72°C で 60 秒間からなる反応を 1 サイクルとして、35 サイクル行った。

PCR 後、反応液を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて精製し、滅菌水 20  $\mu$ L に溶解した。制限酵素 PstI (宝酒造社製) および BamHI (宝

酒造社製) で消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片約110bpを回収した。

一方、プラスミド pBSFc $\gamma$ RIIIa5-3 2.5 $\mu$ g を制限酵素 PstI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約3.5kbpの断片を回収した。

上記で得た hFc $\gamma$ RIIIa cDNA 由来増幅断片とプラスミド pBSFc $\gamma$ RIIIa5-3 由来の断片を、DNA Ligation Kit Ver.2.0(宝酒造社製)を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シーケンサー377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を添付マニュアルに従い使用して決定した。本法により配列決定した全ての挿入 cDNA が、目的の shFc $\gamma$ RIIIa の cDNA の ORF 全長配列をコードすることを確認した。このうち PCR に伴う塩基の読み誤りを該配列内に全く含まないプラスミド DNA を選択した。以下、本プラスミドを pBSFc $\gamma$ RIIIa+His3 と称す。

決定した shFc $\gamma$ RIIIa の全長 cDNA 配列を配列番号 30、それに対応するアミノ酸配列を配列番号 31 に示す。

#### (4) shFc $\gamma$ RIIIa の発現ベクターの構築

shFc $\gamma$ RIIIa の発現ベクターは、以下のようにして構築した。

実施例 10 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pBSFc $\gamma$ RIIIa+His3 3.0 $\mu$ g を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約 620bp の断片を回収した。

一方、W097/10354 に記載のプラスミド pKANTEX93 2.0 $\mu$ g を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および BamHI (宝酒造社製) で消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約 10.7kbp の断片を回収した。

上記で得た shFc $\gamma$ RIIIa cDNA を含む DNA 断片とプラスミド pKANTEX93 由来の断片を、DNA Ligation Kit Ver.2.0(宝酒造社製)を用いて連結反応を行った。該反応液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、得られたアンピシリン耐性コロニーより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。

各プラスミドに挿入された cDNA の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Parkin Elmer 社製) を添付マニュアルに従い使用して決定した。本法により配列決定した全てのプラスミドが、目的の shFc $\gamma$ RIIIa の cDNA を含むことを確認した。得られた発現ベクターを以下、pKANTEXFc $\gamma$ RIIIa-His と称す。

## 2. shFc $\gamma$ RIIIa の安定生産細胞の作製

実施例 10 の 1 項で構築した shFc $\gamma$ RIIIa の発現ベクター pKANTEXFc $\gamma$ RIIIa-His をラットミエローマ YB2/0 細胞 [ATCC CRL-1662、ジャーナル・オブ・セルラー・バイオロジー (J. Cell. Biol.), 93, 576 (1982)] に導入し、shFc $\gamma$ RIIIa の安定生産細胞を以下のようにして作製した。

制限酵素 AatII で消化し、線状化した pKANTEXFc $\gamma$ RIIIa-His の 10  $\mu$ g を  $4 \times 10^6$  細胞のヘレクトロポレーション法 [サイトテクノロジー (Cytotechnology), 3, 133 (1990)] により導入後、40mL の Hybridoma-SFM-FBS(10) [10%FBS を含む Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製)] に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に 200  $\mu$ L/ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 1.0mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の shFc $\gamma$ RIIIa の発現量を実施例 10 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。

培養上清中に shFc $\gamma$ RIIIa の発現が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体生産量を増加させる目的で、G418 を 1.0mg/mL、DHFR の阻害剤である MTX (SIGMA 社製) を 50nmol/L 含む Hybridoma-SFM-FBS(10) 培地に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2mL ずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の shFc $\gamma$ RIIIa の発現量を実施例 10 の 3 項に示す ELISA 法により測定した。培養上清中に shFc $\gamma$ RIIIa の発現が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nmol/L、200nmol/L と順次上昇させ、最終的に G418 を 1.0mg/mL、MTX を 200nmol/L の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS(10) 培地で増殖可能かつ、shFc $\gamma$ RIIIa を高生産する形質転換



株を得た。得られた形質転換株に対して、2 回の限界希釈法によるクローン化を行った。このようにして得られた形質転換株を KC1107 株と名付けた。

### 3. shFc $\gamma$ RIIIa の検出 (ELISA 法)

培養上清中あるいは精製した shFc $\gamma$ RIIIa の検出、定量は、以下に示す ELISA 法により行った。

His-tag に対するマウス抗体 Tetra-His Antibody (QIAGEN 社製) を PBS を用いて 5  $\mu$ g/mL に調製した溶液を 96 ウェルの ELISA 用のプレート (Greiner 社製) に 50  $\mu$ L/ウェルで分注し、4°C、12 時間以上反応させた。反応後、1%BSA-PBS を 100  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、形質転換株の培養上清あるいは精製した shFc $\gamma$ RIIIa の各種希釈溶液を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 50 倍に希釈したビオチン標識マウス抗ヒト CD16 抗体溶液 (PharMingen 社製) を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識 Avidin D 溶液 (Vector 社製) を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50  $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、OD415 を測定した。

### 4. shFc $\gamma$ RIIIa の精製

実施例 10 の 2 項で得られた shFc $\gamma$ RIIIa を生産する形質転換細胞クローン KC1107 を G418 を 1.0mg/mL、MTX を 200nmol/L で含む Hybridoma-SFM-GF(5) [5% Daigo's GF21 (和光純薬社製) を含む Hybridoma-SFM 培地 (Life Technologie 社製)] に  $3 \times 10^5$  細胞/mL となるように懸濁し、182cm<sup>2</sup> フラスコ (Greiner 社製) に 50mL 分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 4 日間培養後、培養上清を回収した。培養上清より Ni-NTA agarose (QIAGEN 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、shFc $\gamma$ RIIIa を精製した。

### 5. 精製した shFc $\gamma$ RIIIa の解析

実施例 10 の 4 項で得られた精製 shFc $\gamma$ RIIIa の濃度は、以下のようにしてアミノ酸組成分析を行い、算出した。精製 shFc $\gamma$ RIIIa の一部を 6mol/L 塩酸、1% フェノール溶液に懸濁し、110°C で 20 時間、気相中で加水分解を行った。加水分解

には、Waters 社製ワークステーションを使用した。加水分解後のアミノ酸を Bidlingmeyer らの方法 [ジャーナル・オブ・クロマトグラフィー (J. Chromatogr.), 336, 93 (1984)] に従い、PTC-アミノ酸誘導体として、PicoTag アミノ酸分析装置 (Waters 社製) を用いて分析した。

次に、精製した shFc $\gamma$ RIIIa の約 0.5  $\mu$ g を公知の方法 [ネイチャー (Nature), 227, 680, (1970)] に従って還元条件下での SDS-PAGE を行い、分子量および精製度を解析した。その結果を第 29 図に示した。第 29 図に示したように、精製した shFc $\gamma$ RIIIa は、分子量 36~38Kd のブロードなバンドが検出された。hFc $\gamma$ RIIIa の細胞外領域には、5 箇所の N-グリコシド型の糖鎖結合可能部位が存在していることが知られており [ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン (J. Exp. Med.), 170, 481 (1989)]、精製した shFc $\gamma$ RIIIa のブロードな分子量の分布は、糖鎖付加の不均一性に起因すると考えられた。一方、精製した shFc $\gamma$ RIIIa の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー PPSQ-10 (島津製作所製) を用いて自動エドマン分解により解析した結果、shFc $\gamma$ RIIIa の cDNA より予想される配列が得られたことより、目的の shFc $\gamma$ RIIIa が精製できたことが確認された。

#### 実施例 11. 各種キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性の評価

1. 還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる抗 GD3 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性の評価

実施例 3 の 1 項に記載の還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる 2 種類の抗 GD3 キメラ抗体である抗 GD3 キメラ抗体 (45%) と抗 GD3 キメラ抗体 (7%) の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性は、以下のようにして ELISA 法を用いて測定した。

実施例 1 の 3 項に記載の方法に従い、96 ウェルの ELISA 用プレート (グライナー社製) に、100pmol/well で GD3 を固定化した。1%BSA-PBS を 100  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、各種抗 GD3 キメラ抗体の 1%BSA-PBS による希釈溶液を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 2.3  $\mu$ g/mL に希釈した shFc $\gamma$ RIIIa 溶液を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、His-tag に対するマ

ウス抗体 Tetra·His Antibody (QIAGEN 社製) を 1%BSA-PBS を用いて  $1\mu\text{g/mL}$  に調製した溶液を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 200 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG1 抗体溶液 (ZYMED 社製) を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、OD415 を測定した。また、別のプレートに各種抗 GD3 キメラ抗体を添加し、実施例 1 の 3 項に記載の ELISA 法を行うことにより、プレートに結合した各種抗 GD3 キメラ抗体量に差がないことを確認した。第 30 図に、各種抗 GD3 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を測定した結果を示した。第 30 図に示したように、抗 GD3 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性は、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の高い抗 GD3 キメラ抗体 (45%) の方が 10 倍以上高かった。

## 2. 還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が $\alpha$ 結合していない糖鎖の割合の異なる抗 FGF-8 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性の評価

実施例 9 の 5 項に記載の還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる 2 種類の抗 FGF-8 キメラ抗体である抗 FGF-8 キメラ抗体 (58%) と抗 FGF-8 キメラ抗体 (13%) の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性は、以下のようにして ELISA 法を用いて測定した。

実施例 9 の 2 項で調製したヒト FGF-8 ペプチドコンジュゲートを 96 ウェルの ELISA 用プレート (グライナー社製) に、 $1.0\mu\text{g/mL}$  で  $50\mu\text{L}$ /ウェルで分注し、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を  $100\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、各種抗 FGF-8 キメラ抗体の 1%BSA-PBS による希釈溶液を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で  $3.0\mu\text{g/mL}$  に希釈した shFc $\gamma$ RIIIa 溶液を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、His-tag に対するマウス抗体 Tetra·His Antibody (QIAGEN 社製) を 1%BSA-PBS を用いて  $1\mu\text{g/mL}$  に調製した溶液を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 200 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG1 抗体溶液 (ZYMED 社製) を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応

後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50  $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、OD415 を測定した。また、別のプレートに各種抗 FGF-8 キメラ抗体を添加し、実施例 9 の 2 項に記載の ELISA 法を行うことにより、プレートに結合した各種抗 FGF-8 キメラ抗体量に差がないことを確認した。第 31 図に、各種抗 FGF-8 キメラ抗体の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性を測定した結果を示した。第 31 図に示したように、抗 FGF-8 キメラ抗体の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性は、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の高い抗 FGF-8 キメラ抗体 (58%) の方が 100 倍以上高かった。

### 3. 還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が $\alpha$ 結合していない糖鎖の割合の異なる抗 CCR4 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性の評価

実施例 4 の 5 項で調製した還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合の異なる 7 種類の抗 CCR4 キメラ抗体の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性は、以下のようにして ELISA 法を用いて測定した。

実施例 4 の 2 項で調製したヒト CCR4 細胞外領域ペプチドコンジュゲートを 96 ウェルの ELISA 用プレート (グライナー社製) に、1.0  $\mu$ g/mL で 50  $\mu$ L/ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を 100  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、各種抗 CCR4 キメラ抗体の 1%BSA-PBS による希釈溶液を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 3.0  $\mu$ g/mL に希釈した shFc  $\gamma$  RIIIa 溶液を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、His-tag に対するマウス抗体 Tetra-His Antibody (QIAGEN 社製) を 1%BSA-PBS を用いて 1  $\mu$ g/mL に調製した溶液を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 200 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG1 抗体溶液 (ZYMED 社製) を 50  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液を 50  $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、OD415 を測定した。また、別のプレートに各種抗 CCR4 キメラ抗体を添加し、実施例 4 の 2 項に記載の ELISA 法を行うことにより、プレートに結合した各種抗 CCR4 キメラ抗体量に差がないことを確認した。第 32A 図に、各種抗 CCR4 キメラ抗体の shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性を測定した結果を示した。第 32A 図に示し

たように、抗 CCR4 キメラ抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性は、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合に比例して上昇した。第 32B 図に、抗体濃度が 4  $\mu$ g/mL および 40  $\mu$ g/mL における還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合（横軸）と shFc $\gamma$ RIIIa 結合活性（縦軸）との関係をプロットした図を示した。第 32B 図に示したように、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が 20%未満の抗体である、抗 CCR4 キメラ抗体（8%）、抗 CCR4 キメラ抗体（9%）、抗 CCR4 キメラ抗体（18%）では、shFc $\gamma$ RIIIa 結合活性は、ほとんど検出されなかった。

以上の結果は、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖を持つ抗体は、 $\alpha$ 1,6-フコースを持つ糖鎖を持つ抗体よりも、高い Fc $\gamma$ RIIIa 結合活性を有することを明確に示したものである。そして、実施例 3 および 4 に示したように、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖を持つ抗体は、 $\alpha$ 1,6-フコースを持つ糖鎖を持つ抗体よりも高い ADCC 活性を示したことから、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖を持つ抗体の高い ADCC 活性は、高い Fc $\gamma$ RIIIa 結合活性に起因することが強く示唆された。また、第 32B 図に示すように Fc $\gamma$ RIIIa 結合活性と還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合との間には比例関係があるので、このような検量線を予め作成しておくことにより、Fc $\gamma$ RIIIa 結合活性を測定することにより抗体組成物の還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合を定量することができる。この方法により、抗体組成物の有する細胞障害活性の測定をすることなく、簡便に細胞障害活性の予測を行うことができる。

実施例 12. レクチン耐性 CHO/DG44 細胞が生産する抗体の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性の評価

実施例 7 の 3 項で精製したレクチン耐性 CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体[以下、抗 CCR4 キメラ抗体（48%）と表記する]、実施例 4 の 3 項で精製した YB2/0 細胞由来の生産株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体 KM2760-1[抗 CCR4 キメラ抗体（87%）]および CHO/DG44 細胞由来の生産株 5-03 株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体 KM3060[抗 CCR4 キメラ抗体（8%）]の shFc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性を

実施例 11 の 3 項に記載の方法に従って測定した。その結果、第 33 図に示したように、レクチン耐性 CHO/CCR4-LCA 株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体 (48%) は、5-03 株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体 (8%) と比較して 100 倍以上高い shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性を示した。また、その活性は、YB2/0 細胞由来の生産株が生産した抗 CCR4 キメラ抗体 (87%) の約 1/3 であった。

以上の結果は、レクチン耐性 CHO/DG44 細胞を用いることにより、親株細胞である CHO/DG44 細胞を用いるよりも、100 倍以上 Fc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性の高い抗体を作製することが可能であることを明確に示すものである。

実施例 13. shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性を指標とした高い ADCC 活性を有する抗体組成物のスクリーニング法

実施例 7 の 1 項で得られた LCA 耐性株 CHO-LCA 株に、実施例 1 の 2 項 (2) に記載の方法に従って、抗 GD3 キメラ抗体発現プラスミド pChi641LHGM4 を導入し、薬剤 MTX による遺伝子増幅を行い、抗 GD3 キメラ抗体を生産する形質転換株を作製した。

得られた形質転換株を用いて限界希釈法によるクローン化を行い、複数個のクローンを得た。各クローンを培養し、コンフルエントになった時点で培養液を回収し、培養上清中の抗 GD3 キメラ抗体の濃度が  $1 \mu\text{g/mL}$  となるように希釈し、該希釈抗体溶液を用いて実施例 11 の 1 項に記載の ELISA 法により、shFc  $\gamma$  RIIIa 結合活性を測定した。同時に、実施例 1 の 4 項で精製した YB2/0 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体および CHO/DG44 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体を  $1 \mu\text{g/mL}$  に希釈した溶液を調製し、それらの shFc  $\gamma$  RIIIa 結合活性も測定した。

測定結果に基づき、CHO/DG44 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体の結合活性以上で、かつ YB2/0 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体の結合活性以下の活性を示す抗体を生産する形質転換細胞クローンを選択した。

選択した形質転換細胞クローンを実施例 1 の 4 項 (2) に記載の方法に従って培養し、培養上清より精製抗体を取得した。精製抗体の単糖組成分析を実施例 3 の 1 項に記載の方法に従って行った結果、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合は 42% であった。以下、本試料を抗 GD3 キメラ抗体 (42%) と表記する。精製した抗 GD3 キメラ抗体 (42%) の抗原結合活性は実施例 1 の 3 項に記載した ELISA 法を用いて評価した結果、実

施例 1 の 4 項で精製した YB2/0 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体および CHO/DG44 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体と同等であった。さらに、実施例 2 の 2 項に記載した方法に従って各抗 GD3 キメラ抗体の ADCC 活性を評価した。比較のために、CHO/DG44 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体で、単糖組成分析の結果、還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が 12% の試料[以下、抗 GD3 キメラ抗体 (12%) と表記する]の ADCC 活性を測定した。その結果を第 34 図に示した。CHO/DG44 細胞由来の生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体 (12%) と比較して、shFc  $\gamma$  RIIIa に対する高い結合活性を指標に選択した生産株が生産した抗 GD3 キメラ抗体 (42%) では、約 30 倍程度の ADCC 活性の上昇が観察された。

以上の結果から、shFc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性の高い抗体組成物をスクリーニングすることで、高い ADCC 活性を有する抗体組成物をスクリーニングできることが明らかとなった。

#### 実施例 14. FGF-8b/Fc 融合蛋白質の作製

##### 1. FGF-8b/Fc 融合タンパクの発現ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 (Mol. Immunol., 37, 1035 (2000)) を制限酵素 ApaI と BamHI で切断して QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて約 1.0kbp のヒト IgG1 サブクラス CH (hC  $\gamma$  1) を含む断片を得た。プラスミド pBluescript II SK (-) (STRATAGENE 社製) も同様の制限酵素で切断して約 2.9kbp の断片を得た。これらの断片を TAKARA DNA Ligation Kit Ver.2 の solution I (宝酒造社製) を用いて連結、大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡社製) を形質転換してプラスミド pH C  $\gamma$  1/SK (-) を構築した。

hC  $\gamma$  1 と FGF8 の cDNA を連結するために配列番号 86 で示した塩基配列を有する合成 DNA を設計した。この合成 DNA は 5' 末端に pBluescript II SK (-) ヘクローニングするための複数の制限酵素認識配列を含んでおり、DNA の合成はプロリゴ社に委託した。TaKaRa Ex Taq 添付 EX Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) (宝酒造社製) を 1 倍濃度で含む 50  $\mu$  L の溶液中にプラスミド pH C  $\gamma$  1/SK (-) を 1ng、0.25mM dNTPs、0.5  $\mu$  mol/L の配列番号 86 に示した塩基配列を有する合成 DNA、0.5  $\mu$  M の M13 primer RV、1.25Unit の TaKaRa Ex Taq を含むように添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (PERKIN ELMER 社製) を用いて、94℃にて 30 秒間、56℃にて 30 秒間、72℃にて 1 分間のサイクルを 35 サイクル行った。該反応液全

量を QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN 社製) を用いて PCR 増幅断片を精製した。精製断片を制限酵素 KpnI と BamHI で切断し、約 0.75kbp の断片を得た。また、プラスミド pBluescript II SK (-) (STRATAGENE 社製) も同様の制限酵素で切断して約 2.9kbp の断片を得た。これらの断片を Ligation high (東洋紡績社製) を用いて連結、大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換してプラスミド p $\Delta$ hC $\gamma$ 1/SK(-) を構築した。

FGF-8b 遺伝子がクローニングされているプラスミド pSC17 (Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 8928 (1992)) を鋳型として、下記のように PCR を行い FGF-8b の構造遺伝子領域断片を得た。TaKaRa Ex Taq 添付 EX Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) (宝酒造社製) を 1 倍濃度で含む 50  $\mu$ L の溶液中にプラスミド pSC17 を 1ng、0.25mM dNTPs、10  $\mu$ mol/L の配列番号 87、88 に示した塩基配列を有する合成 DNA、2.5Unit の TaKaRa Ex Taq を含むように添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9700 (PERKIN ELMER 社製) を用いて、94℃にて 1 分間、55℃にて 1 分間、72℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行い、さらに 72℃10 分間反応させた。該反応液全量から PCR 増幅断片を精製し、精製断片を制限酵素 EcoRI と BamHI で切断し、約 0.66kbp の断片を得た。また、プラスミド pBluescript II SK (-) (STRATAGENE 社製) も同様の制限酵素で切断して約 2.9kbp の断片を得た。これらの断片を T4 DNA Ligase (宝酒造社製) を用いて連結、大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換してプラスミド pFGF-8b/SK(-) を構築した。

次に、プラスミド p $\Delta$ hC $\gamma$ 1/SK(-) を制限酵素 ApaI と EcoRI で切断し、約 3.7kbp の断片を得た。また、プラスミド pFGF-8b/SK(-) も同様の制限酵素で切断し、約 0.6kbp の断片を得た。これらの断片を Ligation high (東洋紡績社製) を用いて連結、大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換してプラスミド pFGF8b+hIgG/SK(-) を構築した。

次に、上記で構築したプラスミド pFGF8b+hIgG/SK(-) を制限酵素 EcoRI と BamHI で切断し、約 1.34kbp の断片を得た。また pKANTEX93 も同様の制限酵素で処理し、約 8.8kbp の断片を得た。これらの断片を Ligation high (東洋紡績社製) を用いて連結、大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換して配列番号 89 に示される FGF8b-Fc 融合蛋白質の cDNA を含む動物細胞用発現ベクター pKANTEX/FGF8Fc を構築した。



## 2. FGF-8b/Fc 融合タンパクの動物細胞を用いた安定発現

上記実施例 14 の 1 項で構築した FGF8-Fc 融合蛋白質の動物細胞用発現ベクター pKANTEX/FGF8Fc を各種細胞に導入し、優良株を選択することで FGF8-Fc 融合蛋白質の安定発現株を以下のようにして作製した。

### (1) ラットミエローマ YB2/0 細胞を用いた生産細胞の作製

FGF8-Fc 融合蛋白質発現ベクター pKANTEX/FGF8Fc の  $10\mu\text{g}$  を  $4\times 10^6$  細胞のラットミエローマ YB2/0 細胞へエレクトロポレーション法により導入後、20~40mL の RPMI1640-FBS (10) に懸濁し、96 ウェル培養用プレート (住友ベークライト社製) に  $200\mu\text{L}$ /ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の FGF8-Fc 融合蛋白質の抗 FGF-8 抗体への結合活性を実施例 14 の 4 項記載の ELISA 法により測定した。抗 FGF-8 抗体としては、KM1334 (USP5952472) を用いた。

培養上清中に FGF-8/Fc 融合蛋白質の産生が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用し融合蛋白質の産生量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/mL、DHFR の阻害剤である MTX (SIGMA 社製) を 50nmol/L 含む Hybridoma-SFM-FBS (5) 培地に懸濁し、24 ウェルプレート (Greiner 社製) に拡大培養した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C で 1~2 週間培養して、50nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換株の増殖が認められたウェルの培養上清中の FGF8-Fc 融合蛋白質の KM1334 への結合活性を実施例 14 の 4 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に FGF-8/Fc 融合蛋白質の産生が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nmol/L の濃度で含む Hybridoma-SFM-FBS (5) 培地で増殖可能かつ、FGF8-Fc 融合蛋白質を高生産する形質転換株 KC1178 を得た。KC1178 は、WO 00/61739 の実施例 8 に示された FUT8 遺伝子の転写物の定量法を用いて該転写物の量が比較的低い株であり、レクチン耐性であった。なお、KC1178 は、平成 15 年 4 月 1 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6) に FERM BP-8350 として寄託されている。

## (2) CHO/DG44 細胞を用いた生産細胞の作製

FGF8-Fc 融合蛋白質発現ベクターpKANTEX/FGF8Fc の  $10\mu\text{g}$  を  $1.6\times 10^6$  細胞の CHO/DG44 細胞へエレクトロポレーション法により導入後、30mL の IMDM-dFBS(10)-HT(1)に懸濁し、96 ウェル培養用プレート(住友ベークライト社製)に  $100\mu\text{L}$ /ウェルずつ分注した。5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、24 時間培養した後、IMDM-dFBS(10)に培地交換し、1~2 週間培養した。HT 非依存的な増殖を示す形質転換株のコロニーが出現し、増殖の認められたウェルより培養上清を回収し、上清中の FGF8-Fc 融合蛋白質の KM1334 への結合活性を実施例 14 の 4 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に FGF-8/Fc 融合蛋白質の産生が認められたウェルの形質転換株については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体産生量を増加させる目的で、MTX(SIGMA 社製)を 50nmol/L 含む IMDM-dFBS(10)培地に懸濁し、24 ウェルプレート(Greiner 社製)に拡大培養した。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内で 37°Cで 1~2 週間培養して、50nmol/L MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。増殖が認められたウェルの培養上清中の FGF8-Fc 融合蛋白質の KM1334 への結合活性を実施例 14 の 4 項記載の ELISA 法により測定した。

培養上清中に FGF-8/Fc 融合蛋白質の産生が認められたウェルの形質転換株については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を上昇させ、MTX を 500nmol/L の濃度で含む IMDM-dFBS(10)培地で増殖可能かつ、FGF8-Fc 融合蛋白質を高生産する形質転換株 KC1179 を得た。なお、KC1179 は、平成 15 年 4 月 1 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 中央第 6)に FERM BP-8351 として寄託されている。

## 3. FGF8-Fc 融合蛋白質の精製

上記実施例 14 の 2 項で作製した FGF8-Fc 融合蛋白質の生産細胞を適当な培地(YB2/0 細胞由来の細胞は 5% GF21(和光純薬製))、0.5mg/mL G418、200nmol/L MTX を含む H-SFM、CHO/DG44 細胞由来の細胞は MTX を 500nmol/L を含む EXCELL301 培地(JRH 社製))を用いて 100~200mL のスケールで培養した。培養上清より Prosep G(ミリポア社製)カラムを使用説明書に従い、用いて FGF8-Fc 融合蛋白質を精製した。精製蛋白質の推定アミノ酸配列を配列番号 90 に示した。

#### 4. 抗 FGF-8 抗体に対する結合活性

実施例 14 の 2 項に記載の YB2/0 産生の FGF-8/Fc 融合蛋白質と、CHO 産生の FGF-8/Fc 融合蛋白質の KM1334 に対する結合活性を以下の様にして ELISA 法を用いて測定した。96 ウェルの ELISA 用プレート (Greiner 社製) に、KM1334 を  $1\mu\text{g/mL}$ 、 $50\mu\text{L}$ /ウェルで分注し、 $4^{\circ}\text{C}$  で 1 晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を  $100\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて活性基をブロックした。各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、形質転換株の培養上清あるいは精製蛋白質を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で 3000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG( $\gamma$ )抗体溶液 (American Qualex 社製) を二次抗体溶液として、 $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄し、ABTS 基質液を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加えて反応させ、十分な発色後に 5%SDS 溶液を  $50\mu\text{L}$ /ウェル加えて反応を停止した。その後測定波長  $415\text{nm}$ 、参照波長  $490\text{nm}$  にて吸光度を測定した。第 35 図に示したように、実施例 14 の 2 項で得られた FGF-8/Fc 融合蛋白質は、KM1334 に対する結合活性を示した。

#### 5. Fc $\gamma$ RIIIa に対する結合活性

実施例 14 の 2 項に記載の YB2/0 産生の FGF-8/Fc 融合蛋白質と、CHO 由来の FGF-8/Fc 融合蛋白質の Fc  $\gamma$  RIIIa に対する結合活性を以下の様にして ELISA 法を用いて測定した。

96 ウェルの ELISA 用プレート (Greiner 社製) に、His-tag に対するマウス抗体 Tetra-His Antibody (QIAGEN 社製) を  $5\mu\text{g/mL}$ 、 $50\mu\text{L}$ /ウェルで分注し、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS を  $100\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。各ウェルを Tween-PBS で洗浄後、1%BSA-PBS で  $5\mu\text{g/mL}$  に希釈した shFc  $\gamma$  RIIIa (V) 溶液を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄し、精製 FGF-8/Fc 融合蛋白質を 1%BSA-PBS で各濃度に希釈した溶液を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄し、1%BSA-PBS で  $1\mu\text{g/mL}$  に希釈したビオチン化 KM1334 をそれぞれ  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、各ウェルを Tween-PBS で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識 Avidin-D (Vector 社製) を 1%BSA-PBS で 4000 倍に希釈した溶液を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄し、

ABTS 基質液を 50  $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、15 分後に 5%SDS 溶液を 50  $\mu$ L/ウェル加えて反応を停止した。その後測定波長 415nm、参照波長 490nm にて吸光度を測定した。

第 36 図には、各種の FGF-8/Fc 融合蛋白質の shFc  $\gamma$  RIIIa (V) に対する結合活性を測定した結果を示した。第 36 図に示したように、YB2/0 産生の FGF-8/Fc 融合蛋白質は CHO/DG44 細胞が産生する FGF-8/Fc 融合蛋白質よりも高い shFc  $\gamma$  RIIIa (V) に対する結合活性を有していた。

参考例 1. CHO 細胞由来の糖鎖合成に係わる各種酵素遺伝子の取得

#### 1. CHO 細胞の FX cDNA 配列の決定

##### (1) CHO/DG44 細胞由来全 RNA の抽出

CHO/DG44 細胞を 10%FBS (Life Technologies 社製) および 1 倍濃度の HT supplement (Life Technologies 社製) を添加した IMDM 培地 (Life Technologies 社製) に懸濁し、 $2 \times 10^5$  個/mL の密度で接着細胞培養用 T75 フラスコ (Greiner 社製) に 15mL 播種した。37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し、培養 2 日目に  $1 \times 10^7$  個を回収後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により添付の説明書に従って全 RNA を抽出した。

##### (2) CHO/DG44 細胞由来全一本鎖 cDNA の調製

参考例 1 の 1 項(1)で調製した全 RNA を 45  $\mu$ L の滅菌水に溶解し、RQ1 RNase-Free DNase (Promega 社製) 1  $\mu$ L、付属の 10 $\times$ DNase buffer 5  $\mu$ L、RNasin Ribonuclease inhibitor (Promega 社製) 0.5  $\mu$ L をそれぞれに添加して、37°C で 30 分間反応させることにより、試料中に混入したゲノム DNA を分解した。反応後、RNAeasy (QIAGEN 社製) により全 RNA を再精製し、50  $\mu$ L の滅菌水に溶解した。

得られた各々の全 RNA 3  $\mu$ L に対し SUPERScript™ Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社製) を用いて添付の説明書に従い、オリゴ (dT) をプライマーとした 20  $\mu$ L の系で逆転写反応を行うことにより、一本鎖 cDNA を合成した。GFPP および FX のクローニングには該反応液の 50 倍希釈水溶液を使用した。使用するまで -80°C で保管した。

##### (3) チャイニーズハムスターFX の cDNA 部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターFX の cDNA 部分断片を取得した。

まず公的データベースに登録されているヒト FX の cDNA (Genebank 登録番号 U58766) およびマウスの cDNA (Genebank 登録番号 M30127) に共通の塩基配列に対して特異的なプライマー (配列番号 42 および配列番号 43 に示す) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、参考例 1 の 1 項(2)で調製した CHO/DG44 由来一本鎖 cDNA を  $1\mu\text{L}$  を含む  $25\mu\text{L}$  の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、 $0.2\text{mmol/L}$  dNTPs、 $0.5\mu\text{mol/L}$  上記遺伝子特異的プライマー (配列番号 42 および配列番号 43)] を調製し、PCR を行った。PCR は  $94^{\circ}\text{C}$  で 5 分間の加熱の後、 $94^{\circ}\text{C}$  で 1 分、 $58^{\circ}\text{C}$  で 2 分間、 $72^{\circ}\text{C}$  で 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに  $72^{\circ}\text{C}$  で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 2%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 301bp を QiaexII Gel Extraction kit (キアゲン社製) を用いて精製し、滅菌水  $20\mu\text{L}$  で溶出した (以下、アガロースゲルからの DNA 断片の精製にはこの方法を用いた)。上記増幅断片  $4\mu\text{L}$  を TOPO TA cloning kit (invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  を形質転換し、得られたカナマイシン耐性クローンより公知の方法に従って各々プラスミド DNA を単離した。その結果、FX cDNA 部分断片が組み込まれた 2 クローンを得た。各々 pCRFX クローン 8、pCRFX クローン 12 と称す。

FX クローン 8、FX クローン 12 に挿入された cDNA の塩基配列は DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入 cDNA がチャイニーズハムスターの FX の ORF 部分配列をコードすることを確認した。

#### (4) RACE 用一本鎖 cDNA の合成

参考例 1 の 1 項(1)で抽出した CHO/DG44 細胞全 RNA からの 5' および 3' RACE 用一本鎖 cDNA の作製を、SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用いて行った。方法は添付の説明書に従った。ただし PowerScript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (CLONTECH 社製) を逆転写酵素として用いた。調製後の一本鎖 cDNA は各々、キット添付の Tricin-EDTA buffer で 10 倍に希釈したものを PCR の鋳型として用いた。

## (5) RACE 法によるチャイニーズハムスターFX 全長 cDNA の決定

参考例 1 の 1 項(3)項で決定したチャイニーズハムスターFX の部分配列をもとにチャイニーズハムスターFX に特異的な 5' RACE 用プライマーFXGSP1-1 (配列番号 44) および FXGSP1-2 (配列番号 45)、チャイニーズハムスターFX 特異的な 3' RACE 用プライマーFXGSP2-1 (配列番号 46) および FXGSP2-2 (配列番号 47) を設計した。

次に Advantage2 PCR Kit (CLONTECH 社製) を用いて、参考例 1 の 1 項(4)で調製した CHO/DG44 細胞由来 RACE 用一本鎖 cDNA を  $1\mu\text{L}$  を含む  $50\mu\text{L}$  の反応液 [1 倍濃度の Advantage 2 PCR buffer (CLONTECH 社製)、 $0.2\text{mmol/L}$  dNTPs、 $0.2\mu\text{mol/L}$  チャイニーズハムスターFX 特異的 RACE 用プライマー、1 倍濃度の共通プライマー (CLONTECH 社製)] を調製し、PCR を行った。PCR は  $94^{\circ}\text{C}$  で 5 秒間、 $68^{\circ}\text{C}$  で 10 秒間、 $72^{\circ}\text{C}$  で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より  $1\mu\text{L}$  をとり Tricin-EDTA buffer で 50 倍に希釈した水溶液  $1\mu\text{L}$  をテンプレートとして使用し、再度反応液を調製し、同条件で PCR を行った。一回目および 2 回目の PCR で用いたテンプレート、プライマーの組み合わせおよび増幅される DNA 断片長を第 6 表に示した。

第 6 表  
チャイニーズハムスターFXcDNA RACE PCR に用いた  
プライマーの組み合わせと PCR 産物の長さ

5' RACE	FX 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP1-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	FXGSP1-2	NUP (Nested Univarsal primer)	300bp
3' RACE	FX 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	FXGSP2-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	FXGSP2-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1100bp

PCR 後、反応液を 1%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片を回収し、滅菌水  $20\mu\text{L}$  で溶出した。上記増幅断片  $4\mu\text{L}$  を TOPO TA cloning kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  を形質転換した。得られたカナマイシン耐性クローンよりプラスミド DNA を単離し、チャイニーズハムスターFX の 5' 領域を含む cDNA5 クロー

ンを得た。各々を FX5' クローン 25、FX5' クローン 26、FX5' クローン 27、FX5' クローン 28、FX5' クローン 31、FX5' クローン 32 と称す。

同様にチャイニーズハムスターFX の 3' 領域を含む cDNA5 クローンを得た。各々 FX3' を FX3' クローン 1、FX3' クローン 3、FX3' クローン 6、FX3' クローン 8、FX3' クローン 9 と称す。

上記、5' および 3' RACE により取得した各クローンの cDNA 部分の塩基配列は、DNA シークエンサー377 (Parkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法より決定した各 cDNA の塩基配列を比較し、PCR に伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターFXcDNA 全長の塩基配列を決定した。決定した配列 を配列番号 48 に示す。

## 2. CHO 細胞の GFPP cDNA 配列の決定

### (1) チャイニーズハムスターGFPP の cDNA 部分断片の取得

以下の手順によりチャイニーズハムスターGFPP の cDNA 部分断片を取得した。まず公的データベースに登録されているヒト GFPP の cDNA (Genebank 登録番号 AF017445)、該配列と相同性の高いマウス EST 配列 (Genebank 登録番号 AI467195、AA422658、BE304325、AI466474)、および Rat EST 配列 (Genebank 登録番号 BF546372、AI058400、AW144783) の塩基配列を比較し、3 種間で保存性の高い領域にラット GFPP に特異的なプライマーGFPP FW9 および GFPP RV9 (配列番号 49 および配列番号 50) を設計した。

次に DNA ポリメラーゼ ExTaq (宝酒造社製) を用いて、参考例 1 の 1 項(2)で調製した CHO/DG44 細胞由来一本鎖 cDNA を 1  $\mu$ L を含む 25  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の ExTaq buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5  $\mu$ mol/L 上記 GFPP 特異的プライマーGFPP FW9 および GFPP RV9 (配列番号 49 および配列番号 50)] を調製し、PCR を行った。PCR は 94°C で 5 分間の加熱の後、94°C で 1 分、58°C で 2 分間、72°C で 3 分間からなる反応を 1 サイクルとして 30 サイクルの後、さらに 72°C で 10 分間加熱する条件で行った。

PCR 後、反応液を 2%アガロースゲル電気泳動に供し、特異的増幅断片 1.4Kbp を回収し、滅菌水 20  $\mu$ L で溶出した。上記増幅断片 4  $\mu$ L を TOPO TA cloning kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  を形質転換した。得られたカナマイシン耐性クローンよりプ

ラスミド DNA を単離し、GFPP cDNA 部分断片が組み込まれた 3 クローンを得た。各々 GFPP クローン 8、GFPP クローン 11、GFPP クローン 12 と称す。

GFPP クローン 8、GFPP クローン 11、GFPP クローン 12 に挿入された cDNA の塩基配列は DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) および Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Perkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。本法により配列決定した挿入 cDNA がチャイニーズハムスターの GFPP の ORF の部分配列をコードすることを確認した。

## (2) RACE 法によるチャイニーズハムスター GFPP 全長 cDNA の決定

参考例 1 の 2 項(1)で決定したチャイニーズハムスター FX の部分配列をもとにチャイニーズハムスター FX に特異的な 5' RACE 用プライマー GFPP GSP1-1 (配列番号 52) および GFPP GSP1-2 (配列番号 53)、チャイニーズハムスター GFPP 特異的な 3' RACE 用プライマー GFPP GSP2-1 (配列番号 54) および GFPP GSP2-2 (配列番号 55) を設計した。

次に Advantage2 PCR Kit (CLONTECH 社製) を用いて、参考例 1 の 1 項(4)で調製した CHO/DG44 細胞由来 RACE 用一本鎖 cDNA 1  $\mu$ L を含む 50  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の Advantage2 PCR buffer (CLONTECH 社製)、0.2 mmol/L dNTPs、0.2  $\mu$ mol/L チャイニーズハムスター GFPP 特異的 RACE 用プライマー、1 倍濃度の共通プライマー (CLONTECH 社製)] を調製し、PCR を行った。PCR は 94°C で 5 秒間、68°C で 10 秒間、72°C で 2 分間からなる反応を 1 サイクルとして 20 サイクル繰り返す条件で行った。

反応終了後、反応液より 1  $\mu$ L をとり Tricin-EDTA buffer で 50 倍に希釈した水溶液 1  $\mu$ L をテンプレートとして、再度反応液を調製し、同条件で PCR を行った。一回目および 2 回目の PCR で用いたテンプレート、プライマーの組み合わせおよび増幅される DNA 断片長を第 7 表に示した。



第7表

チャイニーズハムスターGFPP cDNA RACE PCR に用いた  
プライマーの組み合わせと PCR 産物の長さ

5' RACE	GFPP 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP1-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	GFPPGSP1-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1100bp

3' RACE	GFPP 特異的プライマー	共通プライマー	PCR 増幅産物のサイズ
一回目	GFPPGSP2-1	UPM (Univarsal primer mix)	
二回目	GFPPGSP2-2	NUP (Nested Univarsal primer)	1400bp

PCR 後、反応液を 1% アガロースゲル電気泳動に供し、目的の特異的増幅断片を回収し、滅菌水 20  $\mu$ L で溶出した。上記増幅断片 4  $\mu$ L を TOPO TA cloning kit (Invitrogen 社製) の説明書に従って、プラスミド pCR2.1 へ挿入し、該反応液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  を形質転換した。得られたカナマイシン耐性クローンよりプラスミド DNA を単離し、チャイニーズハムスターGFPP の 5' 領域を含む cDNA4 クローンを得た。各々を GFPP5' クローン 1、GFPP5' クローン 2、GFPP5' クローン 3、GFPP5' クローン 4 と称す。

同様にチャイニーズハムスターGFPP の 3' 領域を含む cDNA5 クローンを得た。各々を GFPP3' クローン 10、GFPP3' クローン 16、GFPP3' クローン 20 と称す。

上記、5' および 3' RACE により取得した各クローンの cDNA 部分の塩基配列は、DNA シークエンサー 377 (Parkin Elmer 社製) を使用して決定した。方法は添付のマニュアルに従った。塩基配列決定後、各 cDNA の塩基配列を比較し、PCR に伴う塩基の読み誤りを除き、チャイニーズハムスターGFPP cDNA 全長の塩基配列を決定した。決定した配列を配列番号 51 に示す。

## 参考例 2. CHO 細胞由来 GMD 遺伝子の取得

### 1. CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列の決定

(1) CHO 細胞由来 GMD 遺伝子の cDNA 取得 (5' および 3' 末端配列を除く部分 cDNA の取得)

GenBank に登録されているヒト GMD cDNA 配列 (GenBank Accession No. AF042377) をクエリーとして、げっ歯類由来 GMD cDNA を公的データベース (BLAST) を用いて検索した結果、3 種類のマウス EST 配列が得られた (GenBank

Accession No. BE986856、BF158988、BE284785)。これら EST 配列を連結させることにより、推定されるマウス GMD cDNA 配列を決定した。

このマウス GMD cDNA 配列より、配列番号 56 で示される塩基配列を有する 28mer のプライマー、配列番号 57 で示される塩基配列を有する 27mer のプライマー、配列番号 58 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマー、配列番号 59 で示される塩基配列を有する 24mer のプライマー、配列番号 60 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。

続いて、CHO 細胞由来 GMD cDNA を増幅するために以下の方法で PCR を行なった。実施例 8 の 1 項 (1) で作製した CHO 細胞由来一本鎖 cDNA 0.5  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の合成 DNA プライマー 2 種類] を調製した。なお、合成 DNA プライマーには配列番号 56 と配列番号 57、配列番号 58 と配列番号 57、配列番号 56 と配列番号 59、配列番号 56 と配列番号 60 の組み合わせを用いた。該反応液を DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製)を用いて 94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

この PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画した結果、配列番号 56 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1.2kbp、配列番号 57 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1.1kbp、配列番号 56 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 350bp、配列番号 56 と配列番号 60 の合成 DNA プライマーを用いた PCR 産物では約 1kbp の DNA 断片が増幅された。これら DNA 断片を回収し、DNA Ligation kit (宝酒造社製)を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5 株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド 22-8 (配列番号 56 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1.2kbp の DNA 断片を有する)、23-3 (配列番号 58 と配列番号 57 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1.1kbp の DNA 断片を有する)、31-5 (配列番号 56 と配列番号 59 の合成 DNA プライマーから増幅された約 350bp の DNA 断片を有する)、34-2 (配列番号 56 と配列番号 60 の合成 DNA プライマーから増幅された約 1kbp の DNA 断片を有する) を得た。これらプラスミドに含まれる CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列を、DNA シークエンサー ABI PRISM 377 (パーキンエルマー社製) を用い、常法に従って決定した (5' 末端側の開始メチオニンより下流 28 塩基の配列、および 3' 末端側の終了コード

ンより上流 27 塩基の配列は合成オリゴ DNA 配列由来のため、マウス GMD cDNA 配列である)。

さらに、プラスミド 22-8 と 34-2 に含まれる CHO 細胞由来 GMD cDNA を組み合わせたプラスミドを作製するため、以下の工程を行った。プラスミド 22-8 の  $1\mu\text{g}$  を制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) で  $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 4kbp の DNA 断片を回収した。プラスミド 34-2 の  $2\mu\text{g}$  を制限酵素 EcoRI で  $37^\circ\text{C}$  にて 16 時間反応後アガロース電気泳動にて分画し、約 150bp の DNA 断片を回収した。それぞれ回収した DNA 断片を、Calf Intestine Alkaline Phosphatase (宝酒造社製) で末端を脱リン酸化した後、DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド CHO-GMD を得た (第 37 図)。

## (2) CHO 細胞由来 GMD cDNA の 5' 末端配列の決定

ヒトおよびマウス GMD cDNA の 5' 末端側非コード (non-coding) 領域の塩基配列より配列番号 61 で示される塩基配列を有する 24mer のプライマー、および CHO 由来 GMD cDNA 配列より配列番号 62 で示される塩基配列を有する 32mer のプライマーを作製し、cDNA を増幅するために以下の方法で PCR を行なった。実施例 8 の 1 項 (1) で得られた CHO 細胞由来の一本鎖 cDNA  $0.5\mu\text{L}$  を鋳型として含む  $20\mu\text{L}$  の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、 $0.2\text{mmol/L}$  の dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、 $0.5\mu\text{mol/L}$  の配列番号 61 と配列番号 62 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、 $94^\circ\text{C}$  にて 5 分間加熱した後、 $94^\circ\text{C}$  にて 1 分間、 $55^\circ\text{C}$  にて 1 分間、 $72^\circ\text{C}$  にて 2 分間のサイクルを 20 サイクル行なった後、さらに  $94^\circ\text{C}$  にて 1 分間、 $68^\circ\text{C}$  にて 2 分間のサイクルを 18 サイクル行なった。該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 300bp の DNA 断片を回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド 5' GMD を得た。DNA シークエンサー 377 (パーキンエルマー社製) を用い、該プラスミドに含まれる CHO 由来 GMD cDNA の開始メチオンンより下流 28 塩基の配列を決定した。

### (3) CHO 細胞由来 GMD cDNA の 3' 末端配列の決定

CHO 細胞由来 GMD の 3' 末端 cDNA 配列を得るため、以下の方法で RACE 法を行なった。実施例 8 の 1 項 (1) で取得した CHO 細胞由来 RNA より、3' RACE 用一本鎖 cDNA の作製を SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社製) を用い、添付の説明書に従って行なった。ただし、逆転写酵素には PowerScript™ Reverse Transcriptase (CLONTECH 社製) を用いた。調製後の一本鎖 cDNA は、キット添付の Tricin-EDTA buffer で 10 倍に希釈したものを PCR の鋳型として用いた。

続いて、上記 3' RACE 用一本鎖 cDNA 1  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 63 で示す 24mer の合成 DNA プライマー [参考例 2 の 1 項 (1) で決定した CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より作製]、1 倍濃度の Universal Primer Mix (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit に付属 ; CLONTECH 社製)] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

反応終了後、該 PCR 反応液より 1  $\mu$ L を取り、Tricin-EDTA buffer (CLONTECH 社製) で 20 倍希釈した水溶液 1  $\mu$ L を鋳型として含む 20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 64 で示す 25mer の合成 DNA プライマー [参考例 2 の 1 項 (1) で決定した CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より作製]、0.5  $\mu$ mol/L の Nested Universal Primer (SMART™ RACE cDNA Amplification Kit に付属 ; CLONTECH 社製)] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94℃にて 5 分間加熱した後、94℃にて 1 分間、68℃にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。

反応終了後、該 PCR 反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 700bp の DNA 断片を回収した。回収した DNA は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue (R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド 3' GMD を得た。DNA シークエンサー 377 (パーキンエルマー社製) を用い、該プラスミドに含まれる CHO 由来 GMD cDNA の終止コドンより上流 27 塩基の配列、および 3' 側の non-coding 領域 415bp の塩基配列を決定した。

以上、参考例 2 の 1 項(1)、(2)、(3) より決定した CHO 由来 GMD 遺伝子の全長 cDNA 配列を配列番号 65、それに対応するアミノ酸配列を配列番号 71 に示す。

## 2. CHO/DG44 細胞の GMD 遺伝子を含むゲノム配列の決定

参考例 2 の 1 項で決定したマウス GMD cDNA 配列より、配列番号 66 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。続いて、以下の方法で CHO 細胞由来ゲノム DNA を取得した。CHO/DG44 細胞由来 KC861 株を IMDM-dFBS(10)-HT(1) 培地 [HT supplement (インビトロジェン社製) を 1 倍濃度で含む IMDM-dFBS(10) 培地] に  $3 \times 10^5$  細胞/mL になるように懸濁し、接着細胞用平底 6 ウェルプレート (Greiner 社製) に 2mL/ウェルずつ分注した。37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内でコンフルエントになるまで培養したのち、該プレートより公知の方法 [ヌクレイック・アシッド・リサーチ (Nucleic Acids Research), 3, 2303 (1976)] に従ってゲノム DNA を調製し、TE-RNase 緩衝液 (pH8.0) (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 200  $\mu$ g/mL RNase A) 150  $\mu$ L に一晩溶解した。

上記で取得した CHO/DG44 細胞由来ゲノム DNA を 100ng、20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 59 と配列番号 66 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイクラー 480 (パーキンエルマー社製) を用いて、94°C にて 5 分間加熱した後 94°C にて 1 分間、68°C にて 2 分間のサイクルを 30 サイクル行なった。反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約 100bp の DNA 断片を回収した。回収した DNA 断片は DNA Ligation kit (宝酒造社製) を用いて pT7Blue(R) ベクター (Novagen 社製) に連結し、得られた組換えプラスミド DNA を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換し、プラスミド ex3 を得た。DNA シークエンサー 377 (パーキンエルマー社製) を用いて該プラスミドに含まれる CHO 細胞由来ゲノム DNA の塩基配列を決定し、配列番号 67 に示した。

次に、参考例 2 の 1 項で決定した CHO 細胞由来 GMD cDNA 配列より、配列番号 68 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマー、および配列番号 69 で示される塩基配列を有する 25mer のプライマーを作製した。続いて、CHO/DG44 由来ゲノム DNA を 100ng、20  $\mu$ L の反応液 [1 倍濃度の EX Taq Buffer (宝酒造社製)、0.2mmol/L dNTPs、0.5 単位の EX Taq polymerase (宝酒造社製)、0.5  $\mu$ mol/L の配列番号 68 と配列番号 69 の合成 DNA プライマー] を調製し、DNA サーマルサイ

クラー480（パーキンエルマー社製）を用いて、94℃にて5分間加熱した後、94℃にて1分間、68℃にて2分間のサイクルを30サイクル行なった。

反応終了後、該反応液をアガロース電気泳動にて分画後、約200bpのDNA断片を回収した。回収したDNA断片はDNA Ligation kit（宝酒造社製）を用いてpT7Blue（R）ベクター（Novagen社製）に連結し、得られた組換えプラスミドDNAを用いて大腸菌DH5 $\alpha$ 株（東洋紡績社製）を形質転換し、プラスミドex4を得た。DNAシーケンサー377（パーキンエルマー社製）を用いて該プラスミドに含まれるCHO細胞由来ゲノムDNAの塩基配列を決定し、配列番号70に示した。

### 参考例3. 抗FGF-8キメラ抗体の作製

#### 1. FGF-8に対するマウス抗体のV領域をコードするcDNAの単離、解析

##### (1) FGF-8に対するマウス抗体生産ハイブリドーマ細胞からのmRNAの調製

FGF-8に対するマウス抗体（抗FGF-8マウス抗体）を生産するハイブリドーマKM1334（FERM BP-5451）の $1 \times 10^7$ 細胞より、mRNAの調製キットであるFast Track mRNA Isolation Kit（Invitrogen社製）を用いて、添付の使用説明書に従い、mRNAを約8 $\mu$ g調製した。

##### (2) 抗FGF-8マウス抗体のH鎖およびL鎖cDNAライブラリーの作製

参考例3の1項(1)で取得したKM1334のmRNAの5 $\mu$ gから、Time Saver cDNASynthesis Kit（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いて、添付の使用説明書に従い、両端にEcoRI-NotIアダプターを有するcDNAを合成した。作製したcDNA全量を20 $\mu$ lの滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgGクラスの抗体のH鎖に対応する約1.5kbのcDNA断片と $\kappa$ クラスのL鎖に対応する約1.0kbのcDNA断片をそれぞれ約0.1 $\mu$ g回収した。次に、各々の約1.5kbのcDNA断片0.1 $\mu$ gおよび約1.0kbのcDNA断片0.1 $\mu$ gと、制限酵素EcoRIで消化後、Calf Intestine Alkaline Phosphataseで末端を脱リン酸化した $\lambda$ ZAPIIベクター1 $\mu$ gを $\lambda$ ZAPII Cloning Kit（Stratagene社製）を用いて、添付の使用説明書に従い、連結した。

連結後の各々の反応液のうち4 $\mu$ lをGigapack II Packaging Extracts Gold（Stratagene社製）を用いて、添付の使用説明書に従い、 $\lambda$ ファージにパッケージングし、適量を大量菌株XL1-Blue（Biotechniques, 5, 376, 1987）に感染させて、KM1334のH鎖cDNAライブラリーおよびL鎖cDNAライブラリーとしてそれぞれ約 $8.1 \times 10^4$ 個と、 $5.5 \times 10^4$ 個のファージクローンを取得した。次に各々の

ファージを常法（モレキュラー・クローニング第2版）に従い、ナイロンメンブレン上に固定した。

### (3) 抗 FGF-8 マウス抗体の H 鎖および L 鎖 cDNA のクローニング

参考例 3 の 1 項 (2) で作製した KM1334 の H 鎖 cDNA ライブラリーおよび L 鎖 cDNA ライブラリーのナイロンメンブレンを、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems (Amersham Pharmacia Biotech 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、マウス抗体の C 領域の cDNA [H 鎖はマウス C $\gamma$ 1 cDNA を含む DNA 断片 (J. Immunol., 146, 2010, 1991)、L 鎖はマウス C $\kappa$  cDNA を含む DNA 断片 (Cell, 22, 197, 1980)] をプローブとして検出し、プローブに強く結合したファージクローンを H 鎖、L 鎖各 10 クローン取得した。次に、 $\lambda$  ZAP II Cloning Kit (Stratagene 社製) の使用説明書に従い、in vivo excision 法により各ファージクローンをプラスミドに変換した。こうして得られた各プラスミドに含まれる cDNA の塩基配列を Big Dye Terminator Kit ver.2 (Applied Biosystems 社製) を用いてジデオキシ法（モレキュラー・クローニング第2版）により決定した。その結果、cDNA の 5' 末端に開始コドンと推定される ATG 配列が存在する完全長の機能的な H 鎖 cDNA を含むプラスミド pKM1334H7-1 および L 鎖 cDNA を含むプラスミド pKM1334L7-1 を得た。

### (4) 抗 FGF-8 マウス抗体の V 領域のアミノ酸配列の解析

配列番号 72 にプラスミド pKM1334H7-1 に含まれていた VH の全塩基配列を、配列番号 73 に推定された全アミノ酸配列を、配列番号 74 にプラスミド pKM1334L7-1 に含まれていた VL の全塩基配列を、配列番号 75 に推定された全アミノ酸配列をそれぞれ示す。既知のマウス抗体の配列データ (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) との比較および精製した抗 FGF-8 マウス抗体 KM1334 の H 鎖および L 鎖の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー PPSQ-10 (島津製作所製) を用いて自動エドマン分解により解析した結果との比較から、単離した各々の cDNA は分泌シグナル配列を含む抗 FGF-8 マウス抗体 KM1334 をコードする完全長 cDNA であり、H 鎖については配列番号 73 に記載のアミノ酸配列の 1 から 19 番目が、L 鎖については配列番号 75 に記載のアミノ酸配列の 1 から 19 番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

次に、抗 FGF-8 マウス抗体 KM1334 の VH および VL のアミノ酸配列（分泌シグナル配列を除いた配列）の新規性について検討した。配列解析システムとして GCG Package (version 9.1、Genetics Computer Group 社製) を用い、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベース (PIR-Protein (Release 56.0)) を BLAST 法 (J. Mol. Biol., 215, 403, 1990) により検索した。その結果、H 鎖、L 鎖ともに完全に一致する配列は認められず、抗 FGF-8 マウス抗体 KM1334 の VH および VL は新規なアミノ酸配列であることが確認された。

また、抗 FGF-8 マウス抗体 KM1334 の VH および VL の CDR を、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。抗 FGF-8 マウス抗体 KM1334 の VH の CDR1、2 および 3 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 76、77 および 78 に、VL の CDR1、2 および 3 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 79、80 および 81 に示した。

## 2. 抗 FGF-8 キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

### (1) 抗 FGF-8 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX1334 の構築

W097/10354 に記載のヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 と参考例 3 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM1334H7-1 および pKM1334L7-1 を用いて抗 FGF-8 キメラ抗体発現ベクター pKANTEX1334 を以下の様にして構築した。

参考例 3 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM1334H7-1 の 50ng を鋳型とし、配列番号 24、25 に記載の塩基配列を有する合成 DNA (GENSET 社製) をプライマーとして終濃度  $0.3 \mu\text{M}$  となるように加え、KOD plus polymerase (TOYOBO 社製) に添付の取扱説明書に従い、 $50 \mu\text{l}$  の系でまず  $94^{\circ}\text{C}$  で 2 分間加熱した後、 $94^{\circ}\text{C}$  15 秒間、 $55^{\circ}\text{C}$  30 秒間、 $68^{\circ}\text{C}$  1 分間の条件で 30 サイクルの PCR を行った。該反応液をエタノール沈殿した後、滅菌水に溶解し、10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) および 10 単位の制限酵素 NotI (New England Biolabs 社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.47kb の ApaI-NotI 断片を約  $0.3 \mu\text{g}$  回収した。

次に、ヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 の  $3 \mu\text{g}$  を 10 単位の制限酵素 ApaI (宝酒造社製) および 10 単位の制限酵素 NotI (New England Biolabs 社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 12.75kb の ApaI-NotI 断片を約  $2 \mu\text{g}$  回収した。

次に、上記で得られた PCR 産物由来の NotI-ApaI 断片  $0.1 \mu\text{g}$  とプラスミド pKANTEX93 由来の NotI-ApaI 断片  $0.1 \mu\text{g}$  を全量  $10 \mu\text{l}$  の滅菌水に加え、Ligation



High (TOYOBO 社製) を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 38 図に示したプラスミド pKANTEX1334H を得た。

次に、参考例 1 の 1 項 (3) で得られたプラスミド pKM1334L7-1 の 50ng を鋳型とし、配列番号 82、83 に記載の塩基配列を有する合成 DNA (GENSET 社製) をプライマーとして終濃度  $0.3 \mu\text{M}$  となるように加え、KOD plus polymerase (TOYOBO 社製) に添付の取扱説明書に従い、 $50 \mu\text{l}$  の系でまず  $94^{\circ}\text{C}$  で 2 分間加熱した後、 $94^{\circ}\text{C}$  15 秒間、 $55^{\circ}\text{C}$  30 秒間、 $68^{\circ}\text{C}$  1 分間の条件で 30 サイクルの PCR を行った。該反応液をエタノール沈殿したのち滅菌水に溶解し、10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および 10 単位の制限酵素 BsiWI (New England Biolabs 社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 0.44kb の EcoRI-BsiWI 断片を約  $0.3 \mu\text{g}$  回収した。

次に、上記で得られたプラスミド pKANTEX1334H の  $3 \mu\text{g}$  を 10 単位の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) および制限酵素 BsiWI (New England Biolabs 社製) を用いて  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。該反応液をアガロースゲル電気泳動にて分画し、約 13.20kb の EcoRI-BsiWI 断片を約  $2 \mu\text{g}$  回収した。

次に、上記で得られた PCR 産物由来の EcoRI-BsiWI 断片  $0.1 \mu\text{g}$  とプラスミド pKANTEX1334H 由来の EcoRI-BsiWI 断片  $0.1 \mu\text{g}$  を全量  $10 \mu\text{l}$  の滅菌水に加え、Ligation High (TOYOBO 社製) を用いて連結した。この様にして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換し、第 38 図に示したプラスミド pKANTEX1334 を得た。

得られたプラスミドの 400ng を用い、Big Dye Terminator Kit ver.2 (Appliedbiosystems 社製) を用いてジデオキシ法 (モレキュラー・クローニング第 2 版) による塩基配列の解析を行った結果、目的の DNA がクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

#### 産業上の利用可能性

本発明は、抗体組成物の  $\text{Fc}\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を高める方法、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法、抗体組成物の  $\text{Fc}\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を高められた抗体組成物を製造する方法、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法、

N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を用いて製造された Fc 融合蛋白質組成物、およびその製造方法を提供することができる。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号 4-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 5-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 8-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 9-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 10-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 11-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 12-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 13-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 14-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 15-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 16-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 17-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 18-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 22-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 26-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 29-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 32-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 33-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 34-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 35-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 36-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 37-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 38-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 39-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 40-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 41-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 42-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 43-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 44-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 45-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 46-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 47-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 49-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 50-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 52-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 53-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 54-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 55-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 56-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 57-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 58-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 59-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 60-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 61-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 62-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 63-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 64-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 66-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 68-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 69-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 82-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 83-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 84-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 85-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 86-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 87-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 88-人工配列の説明：合成 DNA  
配列番号 89-人工配列の説明：合成 DNA

## 請 求 の 範 囲

1. 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物の Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を高める方法。
2. 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の修飾が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖を抗体分子の Fc 領域に結合させることである、請求の範囲 1 に記載の方法。
3. 糖鎖が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞が合成する糖鎖であることを特徴とする、請求の範囲 1 または 2 に記載の方法。
4. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 3 に記載の方法。
  - (a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する蛋白質；
  - (b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する蛋白質；
  - (c) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。
5. 細胞が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞である、請求の範囲 3 または 4 に記載の方法。
6. 細胞が、少なくとも、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、請求の範囲 3～5 のいずれか 1 項に記載の方法。
  - (a) レンズマメレクチン；
  - (b) エンドウマメレクチン；
  - (c) ソラマメレクチン；
  - (d) ヒイロチャワンタケレクチン。
7. 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 3～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

8. 細胞が、以下の (a)～(i) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 3～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) チャイニーズハムスター卵巢組織由来 CHO 細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞；
- (c) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (d) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞
- (e) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞
- (f) ハイブリドーマ細胞；
- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (h) 胚性幹細胞；
- (i) 受精卵細胞。

9. 抗体分子が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる抗体分子である、請求の範囲 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) ヒト抗体；
- (b) ヒト化抗体；
- (c) (a) または (b) の Fc 領域を含む抗体の断片；
- (d) (a) または (b) の Fc 領域を有する融合蛋白質。

10. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

11. 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖において、全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が 20%以上である、請求の範囲 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

12. 請求の範囲 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法により、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を高める方法。

13. 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖を修飾することを含む、抗体組成物の Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性が高められた抗体組成物を製造する方法。

14. 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の修飾が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖を抗体分子の Fc 領域に結合させることである、請求の範囲 13 に記載の方法。

15. 糖鎖が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質の活性が低下または欠失した細胞が合成する糖鎖であることを特徴とする、請求の範囲 13 または 14 に記載の方法。

16. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースを結合する糖鎖の修飾に関与する蛋白質が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 15 に記載の方法。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する蛋白質；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する蛋白質；

(c) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。

17. 細胞が、N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞である、請求の範囲 15 または 16 に記載の方法。

18. 細胞が、少なくとも、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、請求の範囲 15~17 のいずれか 1 項に記載の方法。

(a) レンズマメレクチン；

(b) エンドウマメレクチン；

(c) ソラマメレクチン；

(d) ヒイロチャワンタケレクチン。

19. 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 15~18 のいずれか 1 項に記載の方法。

20. 細胞が、以下の (a)~(i) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 15~19 のいずれか 1 項に記載の方法。

(a) チャイニーズハムスター卵巢組織由来 CHO 細胞；

(b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL. P2. G11. 16Ag. 20 細胞；

(c) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；

(d) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞

(e) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞

(f) ハイブリドーマ細胞；

- (g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
  - (h) 胚性幹細胞；
  - (i) 受精卵細胞。
21. 抗体分子が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる抗体分子である、請求の範囲 13～20 のいずれか 1 項に記載の方法。
- (a) ヒト抗体；
  - (b) ヒト化抗体；
  - (c) (a) または (b) の Fc 領域を含む抗体の断片；
  - (d) (a) または (b) の Fc 領域を有する融合蛋白質。
22. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 13～21 のいずれか 1 項に記載の方法。
23. 抗体分子の Fc 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖において、全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合していない糖鎖の割合が 20%以上である、請求の範囲 13～22 のいずれか 1 項に記載の方法。
24. 請求の範囲 12 の方法を含む、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を製造する方法。
25. 請求の範囲 13～24 のいずれか 1 項に記載の製造方法により製造される抗体組成物。
26. 抗原と被験抗体組成物とを反応させて抗原と抗体組成物の複合体を形成し、該複合体を Fc $\gamma$  受容体 IIIa と接触させて Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物中の糖鎖の割合と Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法。
27. 抗原と被験抗体組成物とを反応させて抗原と抗体組成物の複合体を形成し、該複合体を Fc $\gamma$  受容体 IIIa と接触させ、Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性と Fc $\gamma$  受容体 IIIa に対する結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を検出する方法。
28. 被験抗体組成物と Fc $\gamma$  受容体 IIIa とを接触させ、抗体組成物と Fc $\gamma$  受容体 IIIa との結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物中の糖鎖の割合と Fc

$\gamma$  受容体 IIIa との結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を検出する方法。

29. 被験抗体組成物と Fc  $\gamma$  受容体 IIIa とを接触させ、抗体組成物と Fc  $\gamma$  受容体 IIIa との結合活性を測定し、スタンダードの抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性と Fc  $\gamma$  受容体 IIIa との結合活性を示す検量線と比較することにより、抗体組成物の抗体依存性細胞障害活性を検出する方法。

30. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が  $\alpha$  結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性を有する細胞を用いて製造された Fc 融合蛋白質組成物。

31. 細胞が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる蛋白質の活性が低下または欠失した細胞である、請求の範囲 30 に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

(a) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素蛋白質；

(b) N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が  $\alpha$  結合する糖鎖修飾に関与する酵素蛋白質；

(c) 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質。

32. 細胞が、少なくとも、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれるレクチンの一つに耐性である、請求の範囲 30 または 31 に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

(a) レンズマメレクチン；

(b) エンドウマメレクチン；

(c) ソラマメレクチン；

(d) ヒロチャワンタケレクチン。

33. 細胞が、Fc 融合蛋白質をコードする遺伝子を導入した細胞である、請求の範囲 30～32 のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

34. Fc が抗体分子の IgG クラス由来である、請求の範囲 33 に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

35. 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 30～34 のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。



36. 細胞が、マウスミエローマ細胞である、請求の範囲 30～35 のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

37. マウスミエローマ細胞が、NS0 細胞または SP2/0-Ag14 細胞である請求の範囲 36 記載の Fc 融合蛋白質組成物。

38. 細胞が、以下の (a)～(g) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 30～37 のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞；
- (c) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (d) 抗体を生産するハイブリドーマ細胞；
- (e) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (f) 胚性幹細胞；
- (g) 受精卵細胞。

39. N-グリコシド結合複合型糖鎖を抗体分子の Fc 領域に有する Fc 融合蛋白質からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である Fc 融合蛋白質組成物。

40. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に  $\alpha$  結合していない糖鎖である、請求の範囲 39 に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

41. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 39 または 40 に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

42. Fc 融合蛋白質組成物が、Fc 融合繊維芽細胞増殖因子-8 である請求の範囲 30～41 のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物。

43. 請求の範囲 30～42 のいずれか 1 項に記載の Fc 融合蛋白質組成物を生産する細胞。

44. 細胞が、酵母、動物細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選ばれる、請求の範囲 43 に記載の細胞。

45. 細胞が、マウスミエローマ細胞である、請求の範囲 43 または 44 に記載の細胞。

46. マウスミエローマ細胞が、NS0 細胞または SP2/0-Ag14 細胞である請求の範囲 45 に記載の細胞。

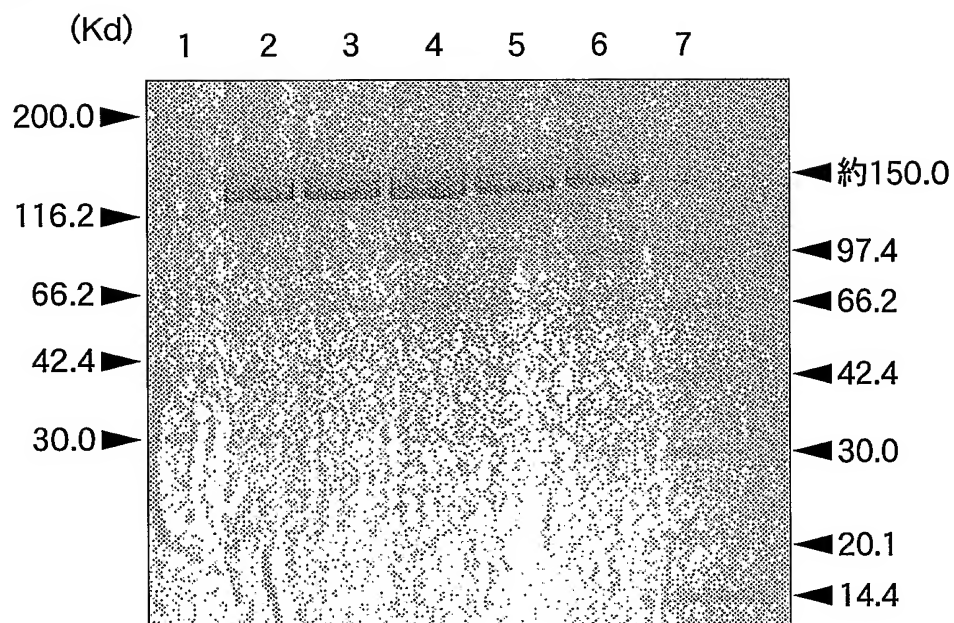
47. 細胞が、以下の (a)～(g) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 43～46 のいずれか 1 項に記載の細胞。

- (a) チャイニーズハムスター卵巢組織由来 CHO 細胞；
- (b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL. P2. G11. 16Ag. 20 細胞；
- (c) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
- (d) 抗体を生産するハイブリドーマ細胞；
- (e) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
- (f) 胚性幹細胞；
- (g) 受精卵細胞。

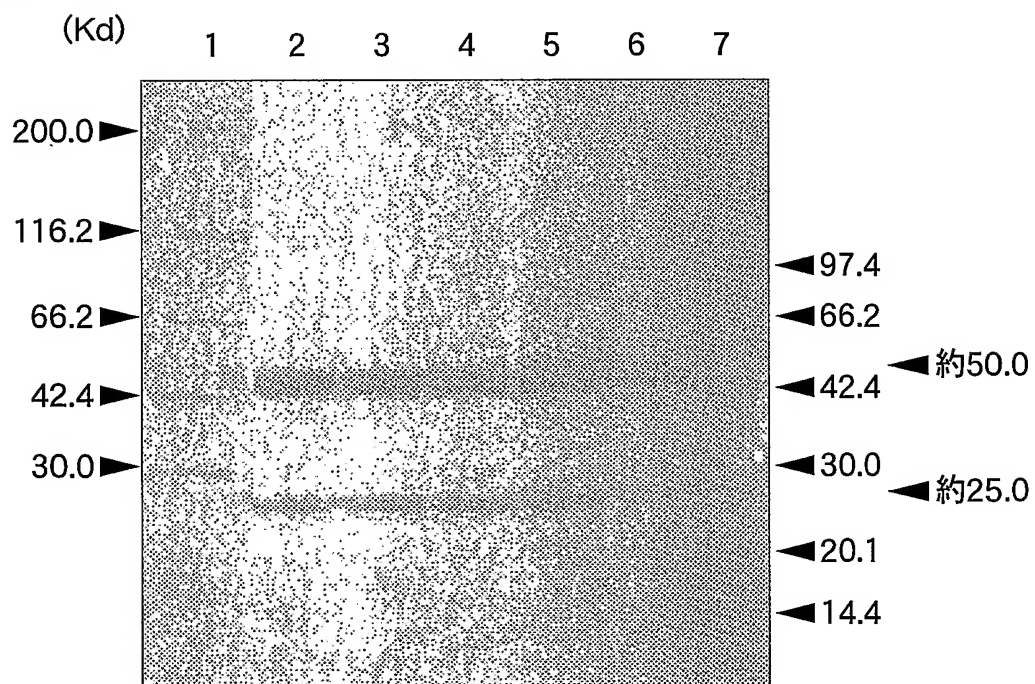
48. 請求の範囲 43～47 のいずれか 1 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に Fc 融合蛋白質組成物を生成蓄積させ、該培養物から Fc 融合蛋白質組成物を採取する工程を含む、Fc 融合蛋白質組成物の製造方法。

## 第 1 図

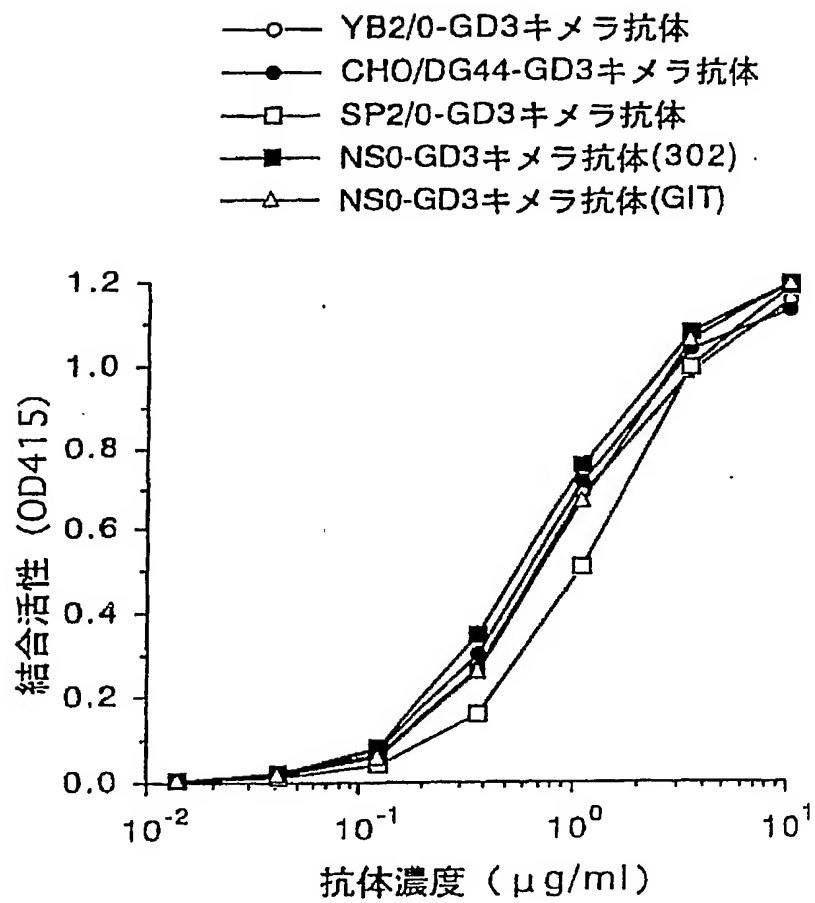
1A



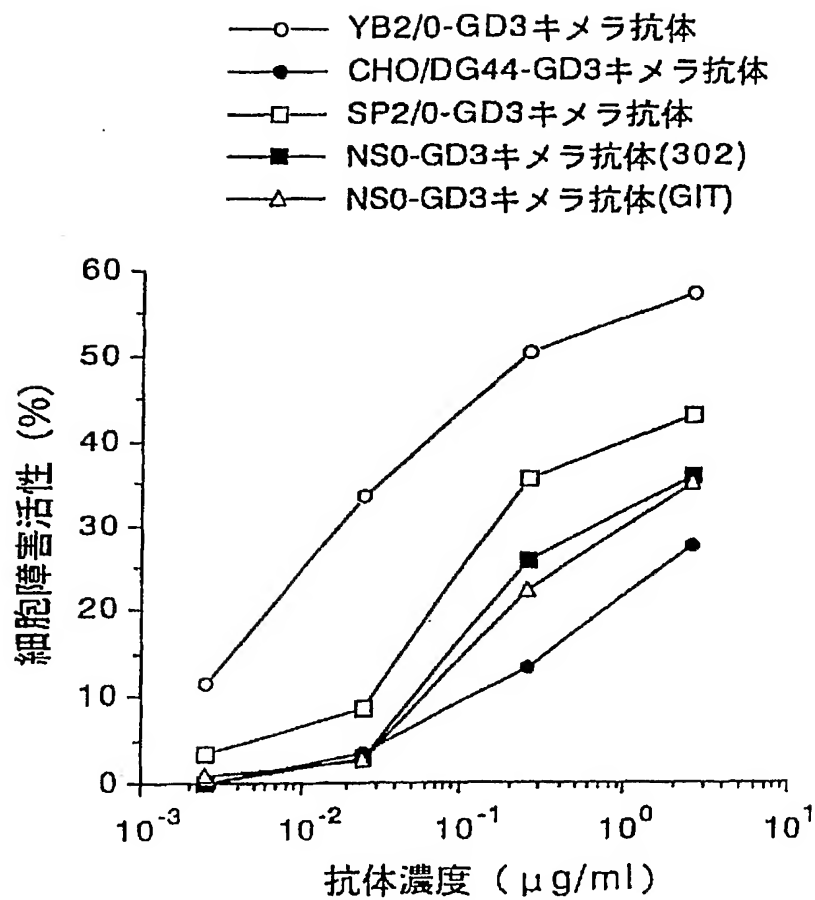
1B



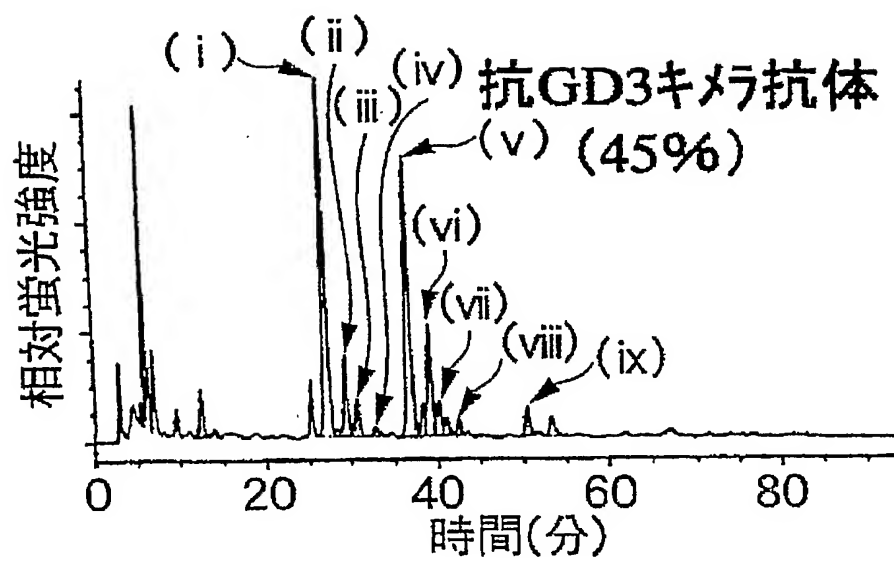
第2図



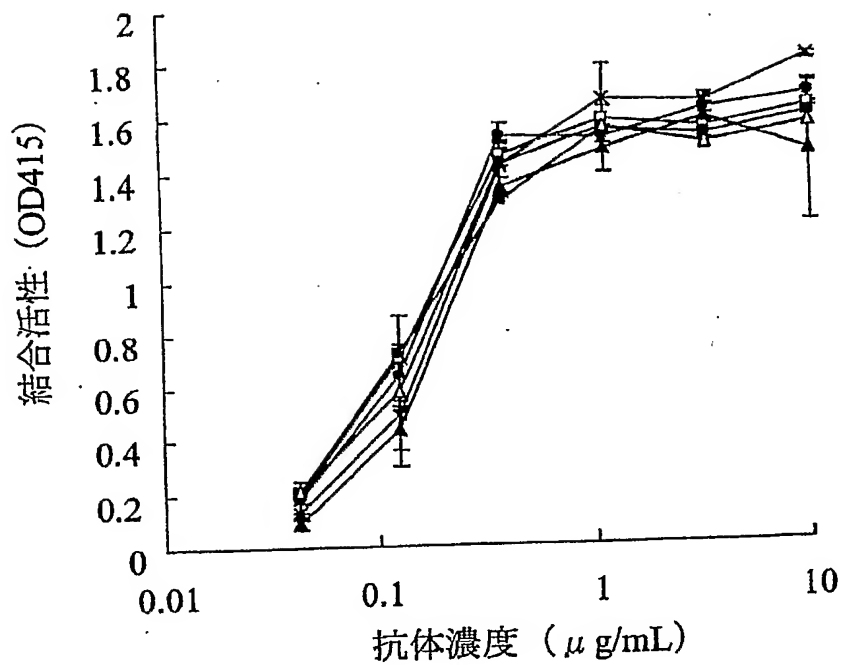
## 第3図



第4図

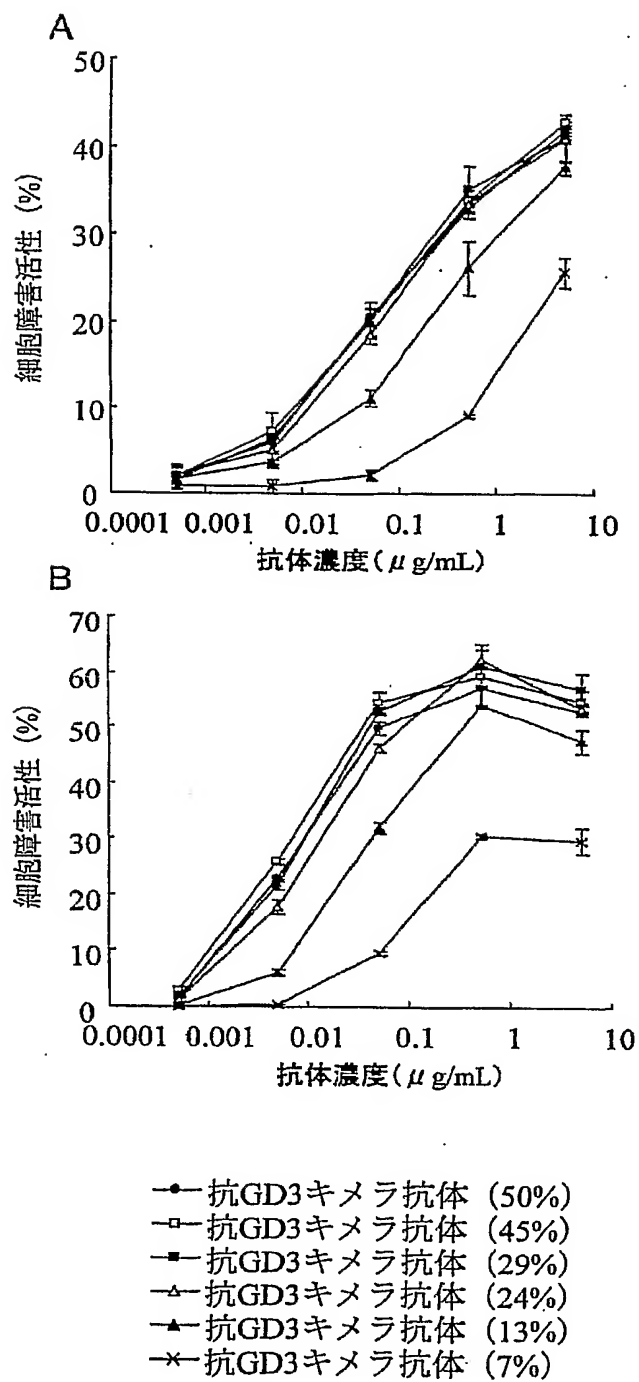


第5図



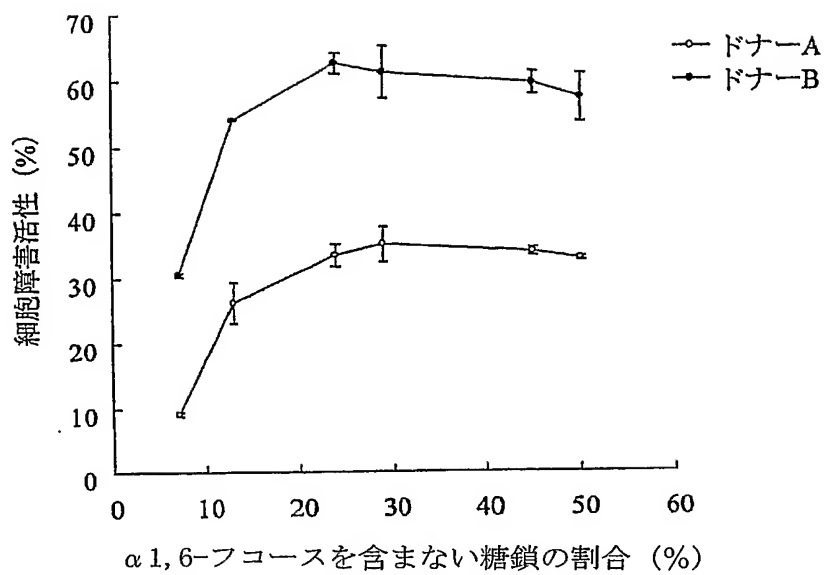
- 抗GD3キメラ抗体 (50%)
- 抗GD3キメラ抗体 (45%)
- 抗GD3キメラ抗体 (29%)
- △— 抗GD3キメラ抗体 (24%)
- ▲— 抗GD3キメラ抗体 (13%)
- ×— 抗GD3キメラ抗体 (7%)

## 第6図

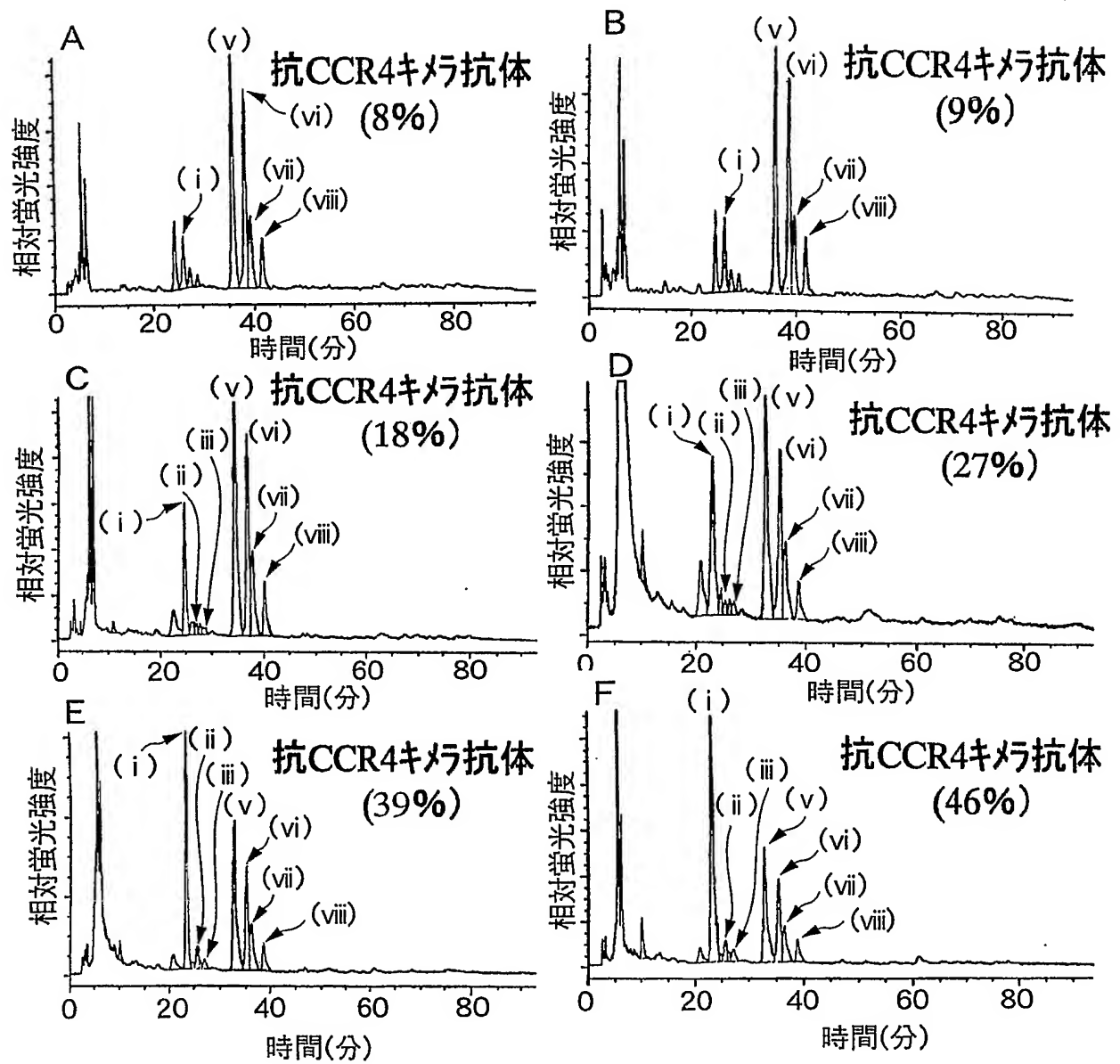




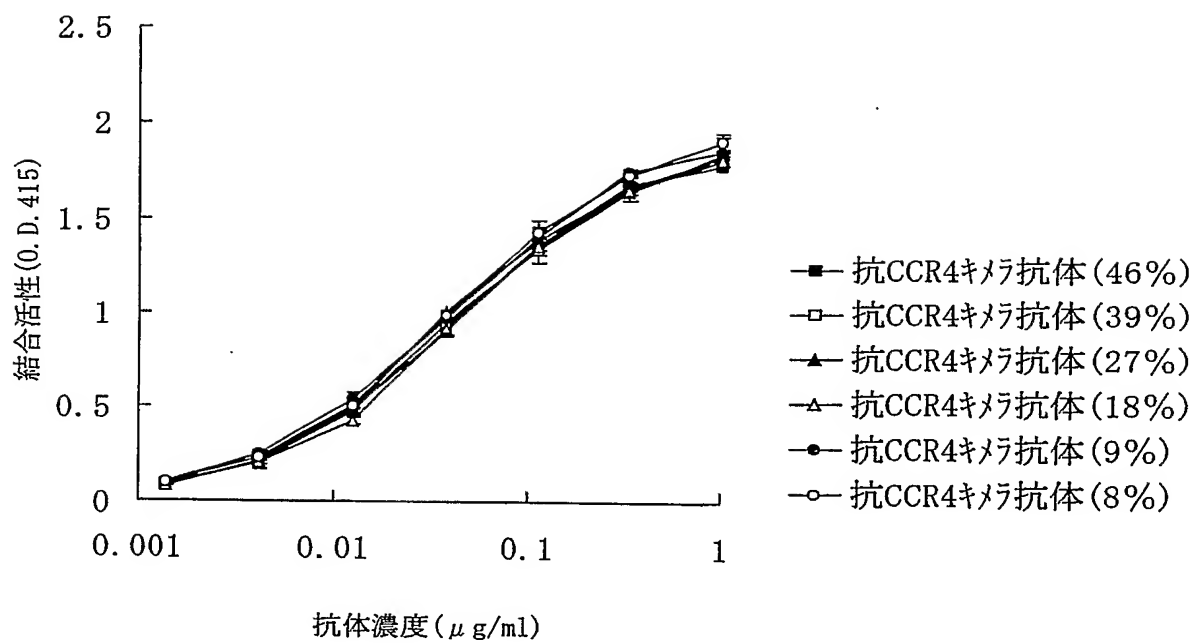
第7図



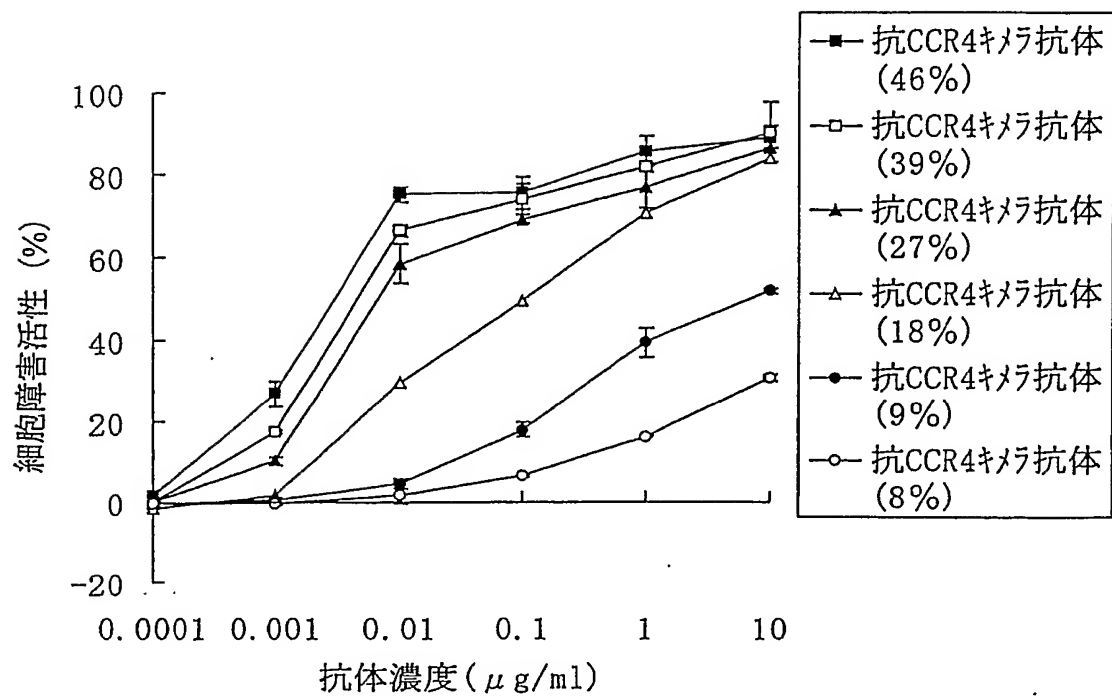
第 8 図



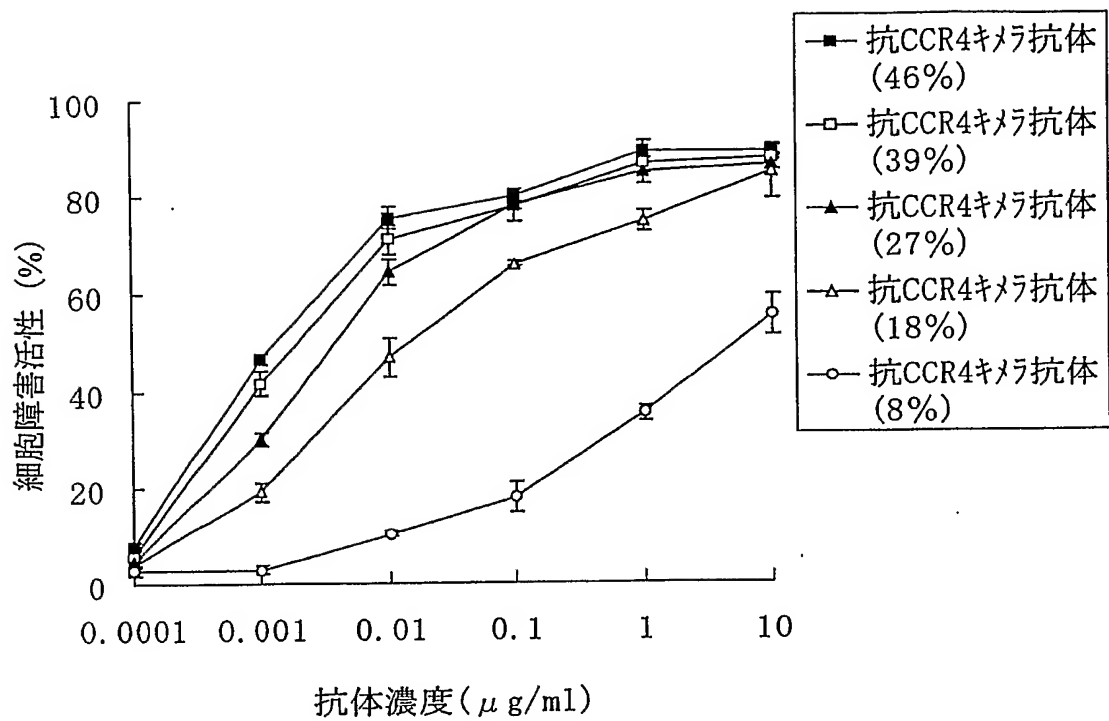
第9図



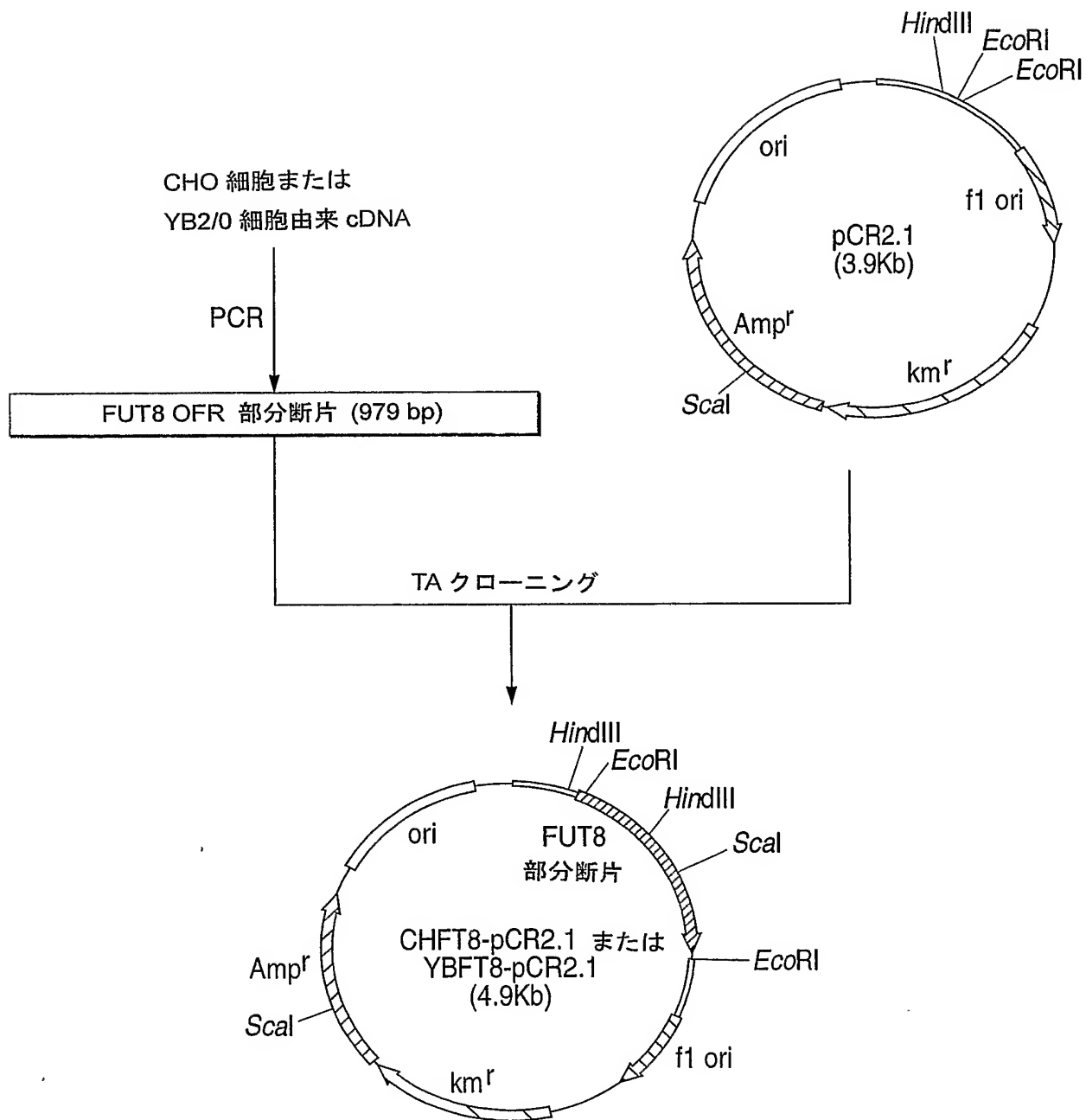
第 10 図



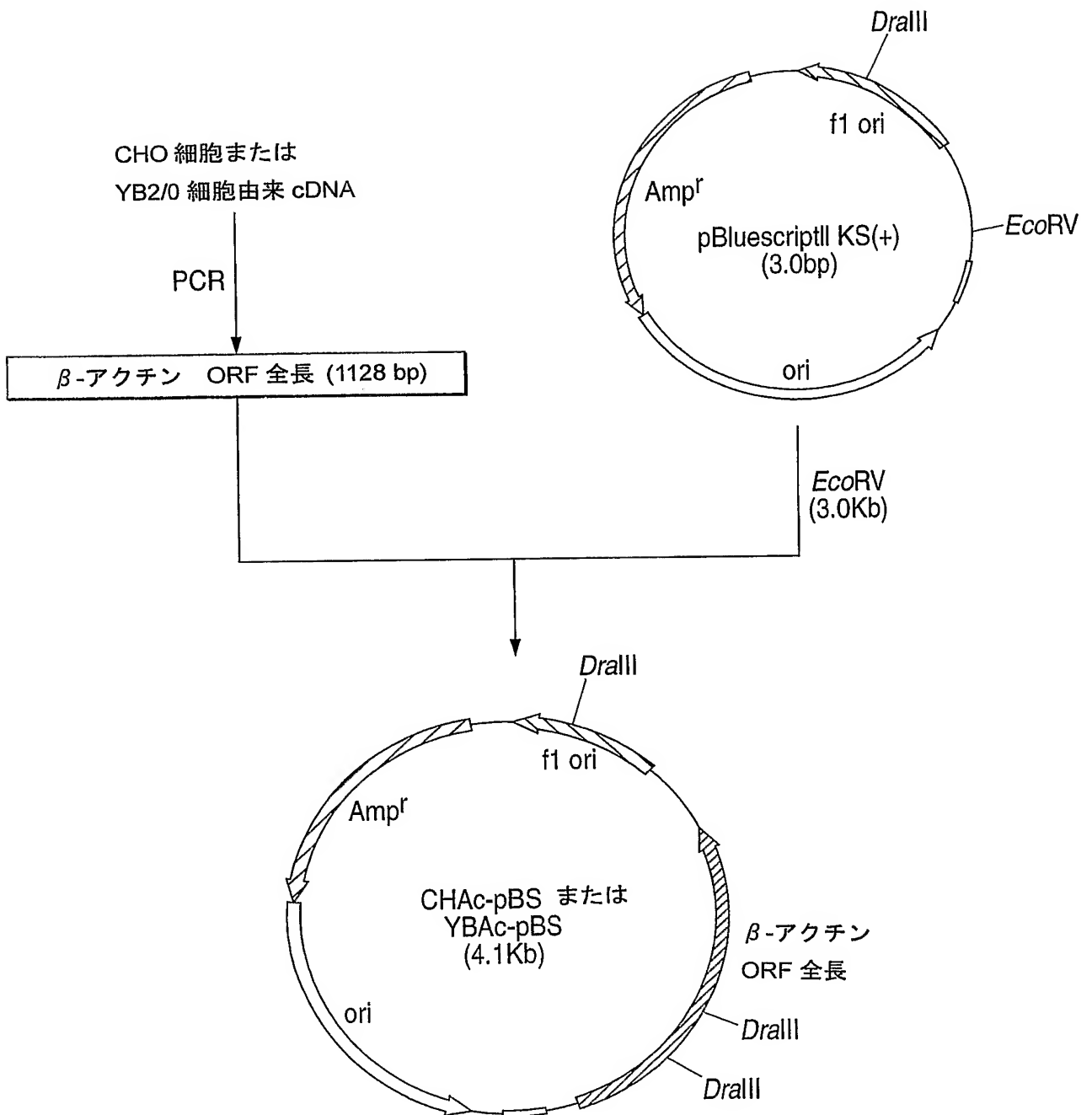
第 1 1 図



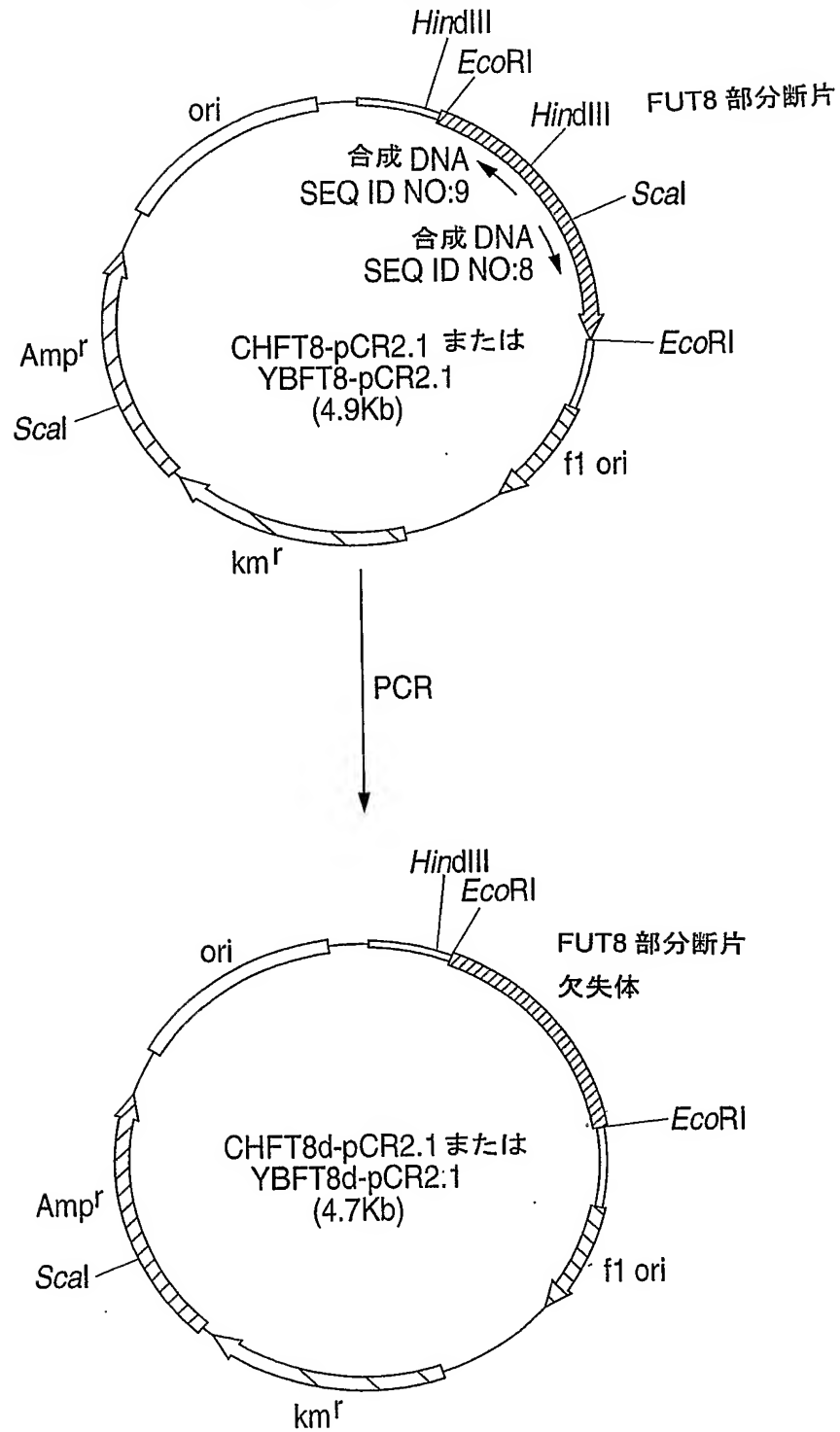
## 第 1 2 図



## 第 1 3 図

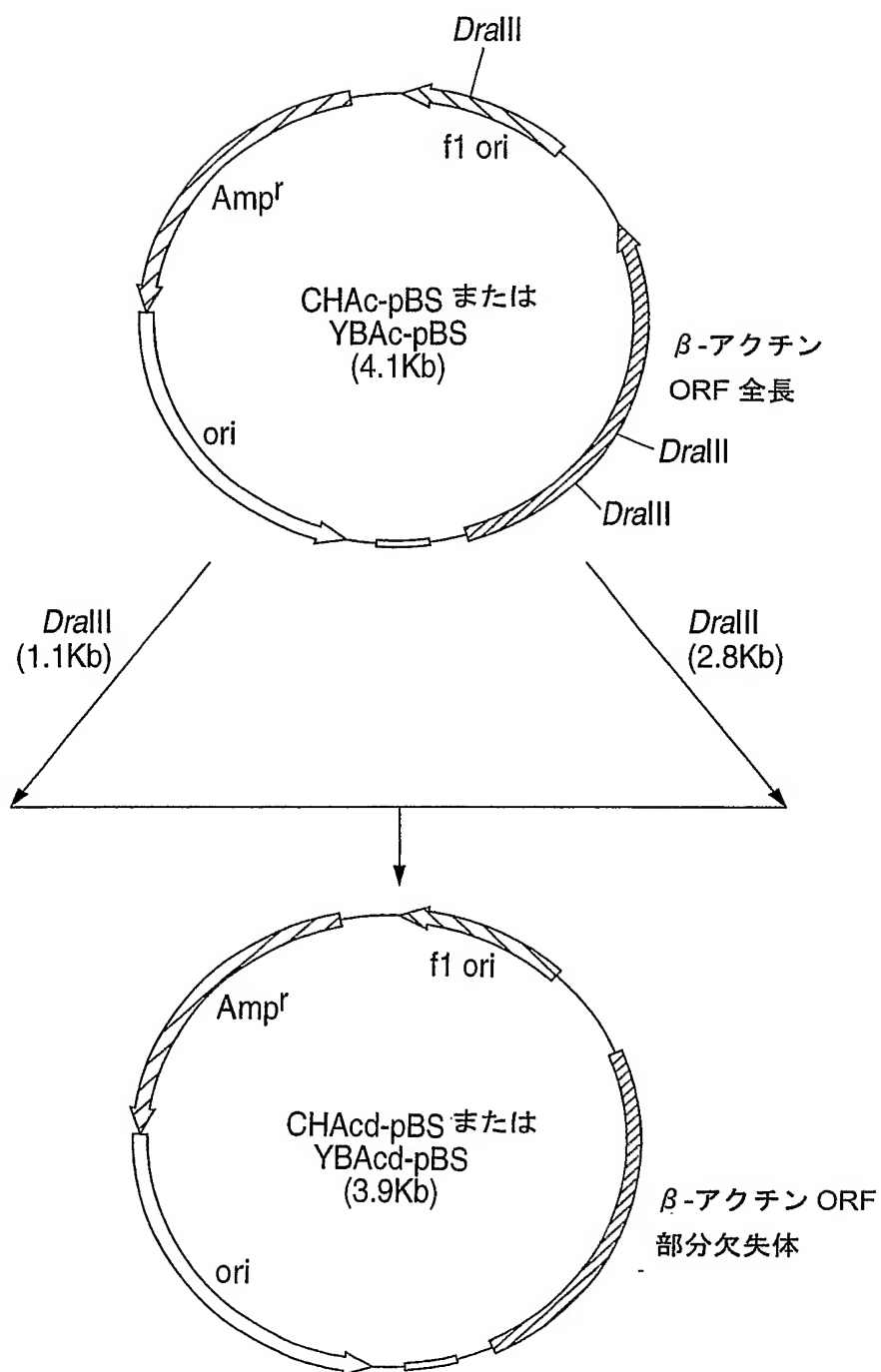


第 1 4 図

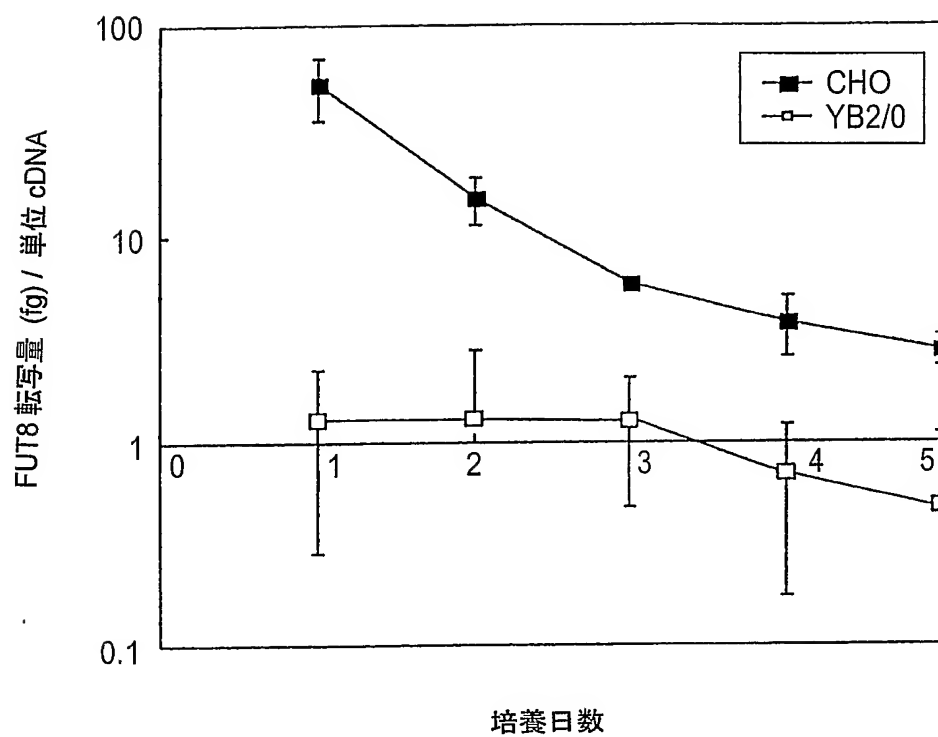




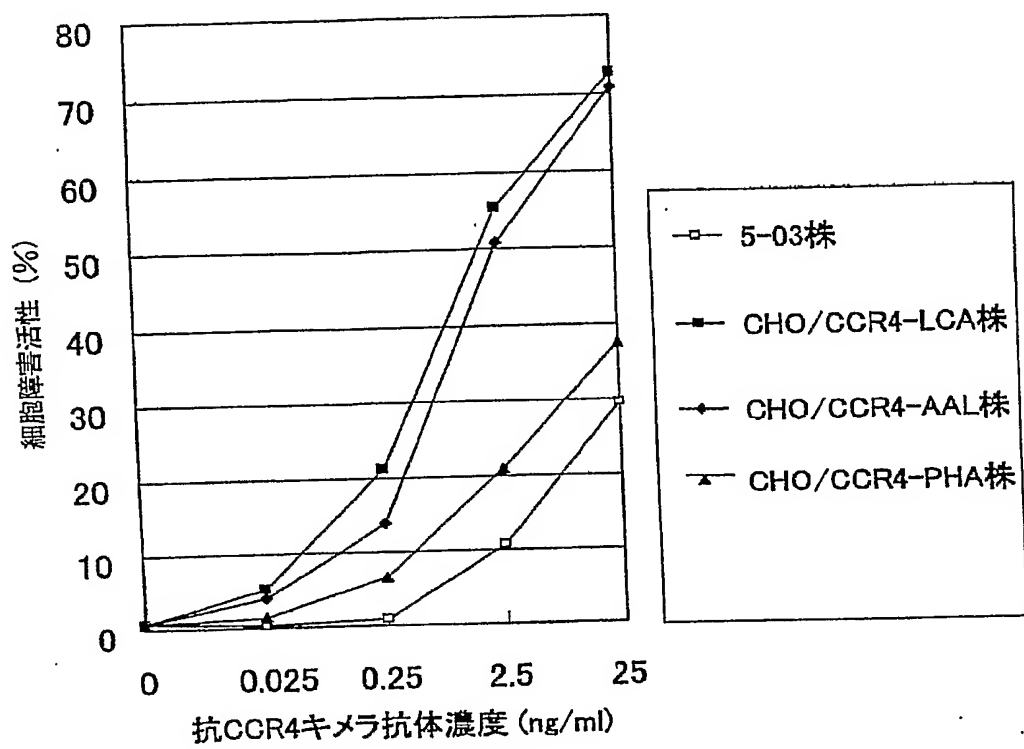
## 第 1 5 図



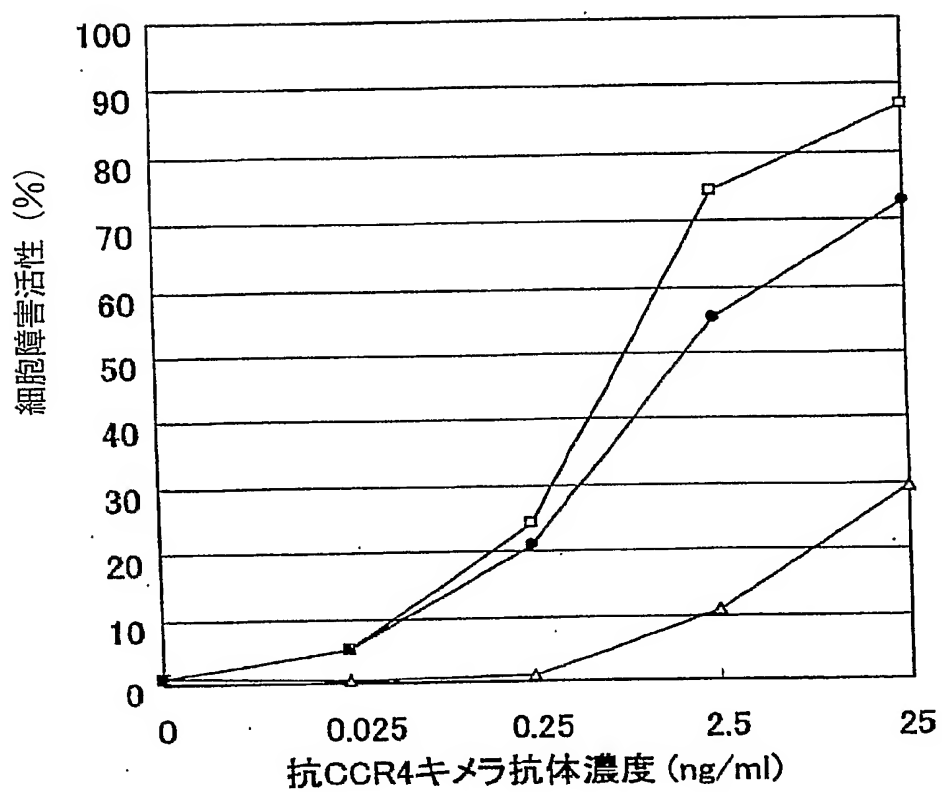
第 16 図



第 1 7 図



第18図

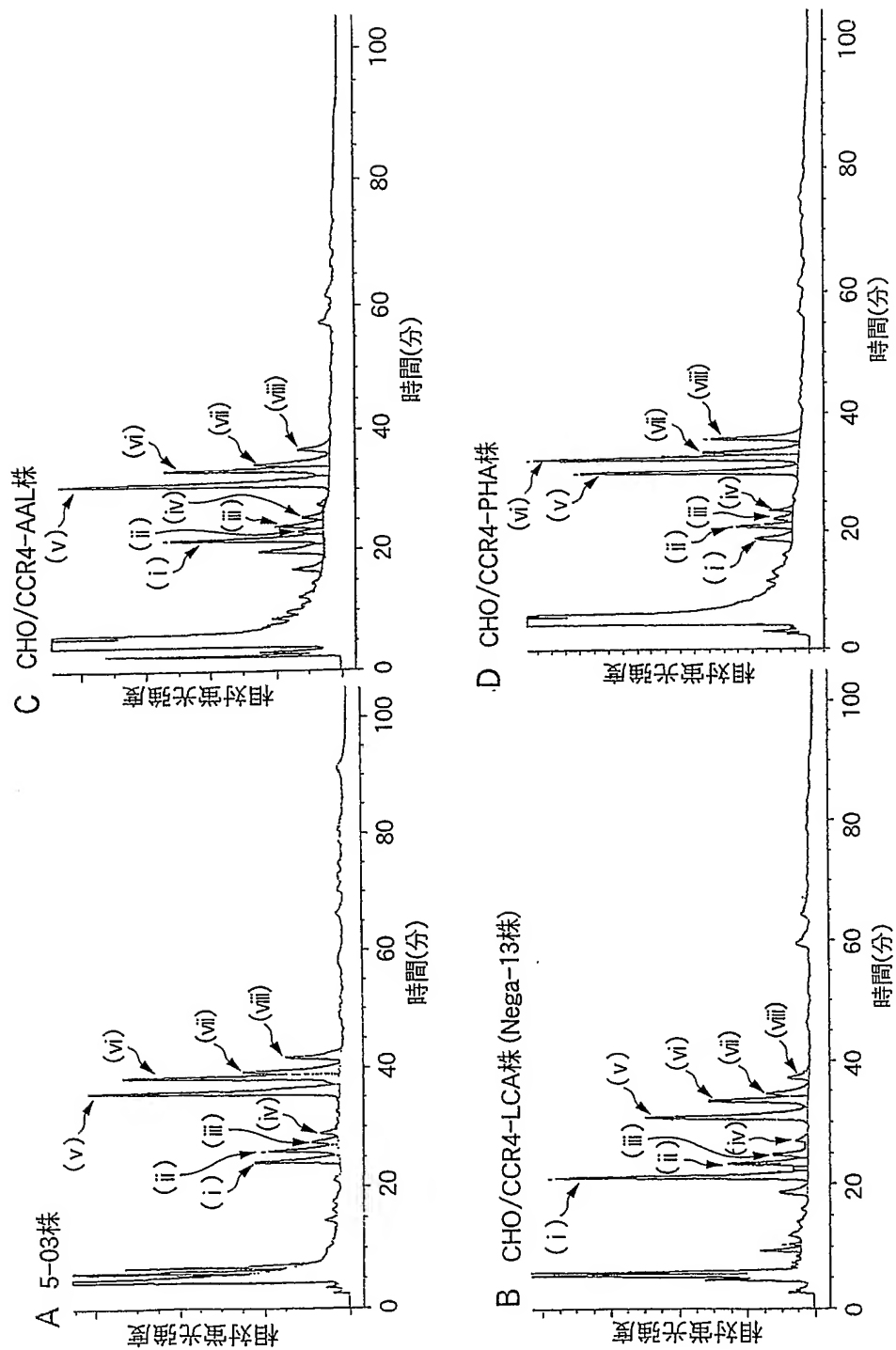


—□— YB2/0株 (KM2760#58-35-16)

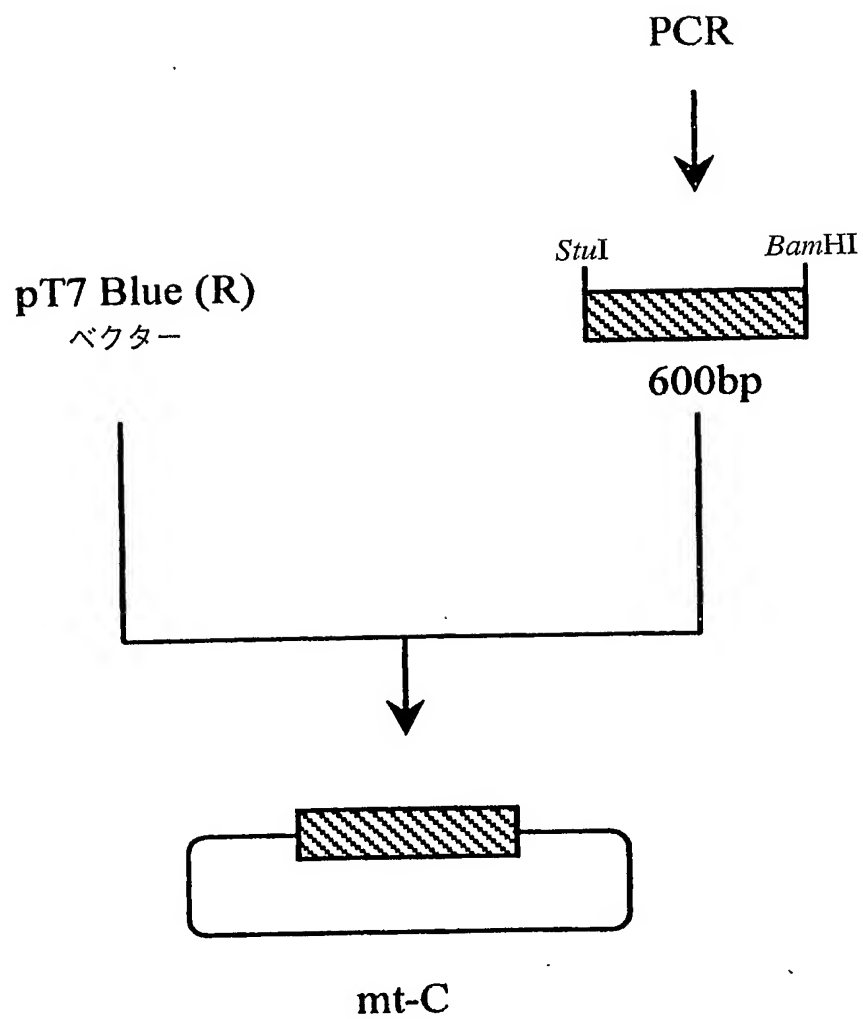
—△— 5-03株

—●— CHO/CCR4-LCA株

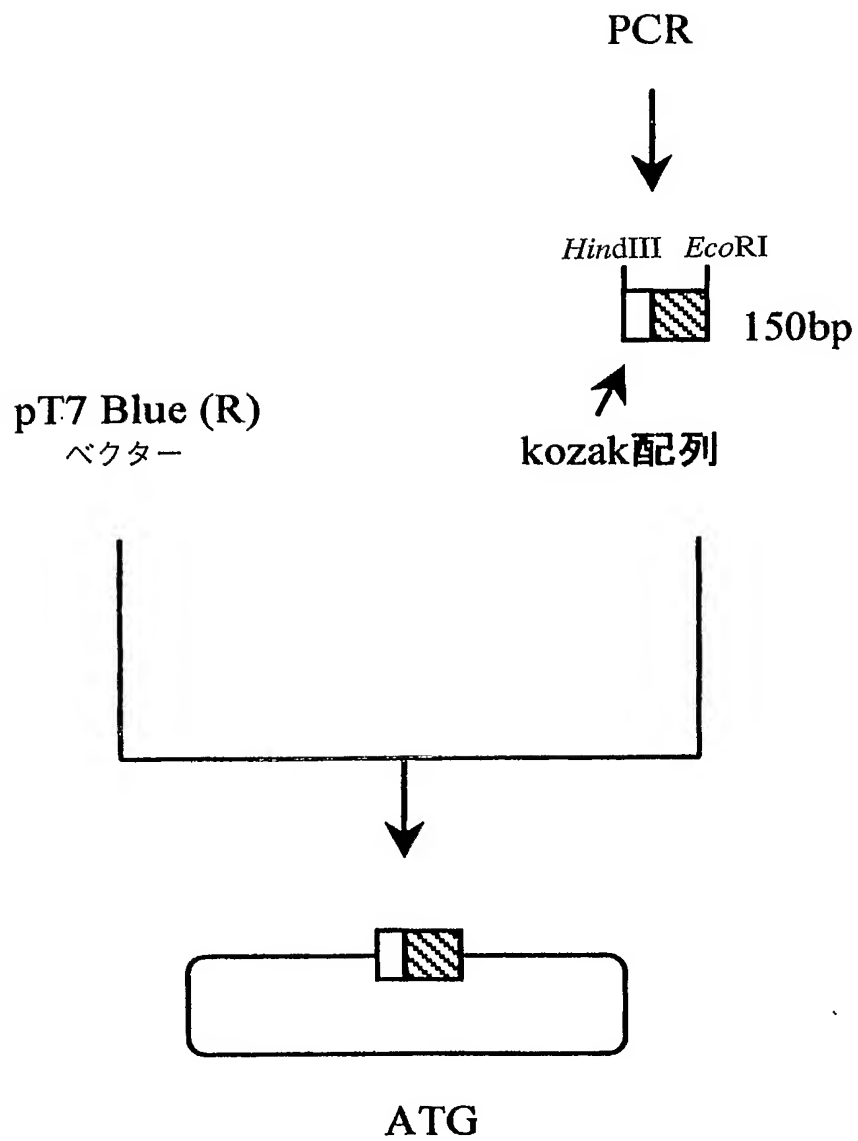
## 第19図



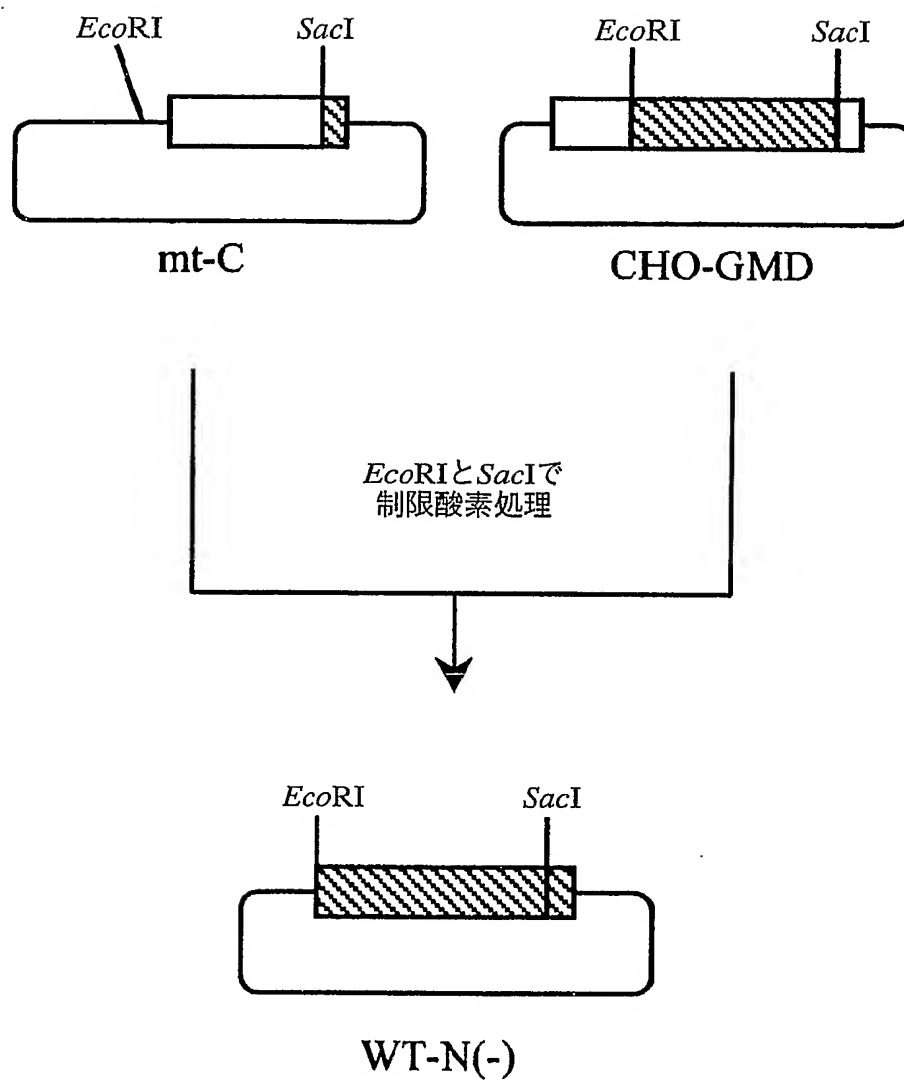
## 第 20 図



## 第 2 1 図

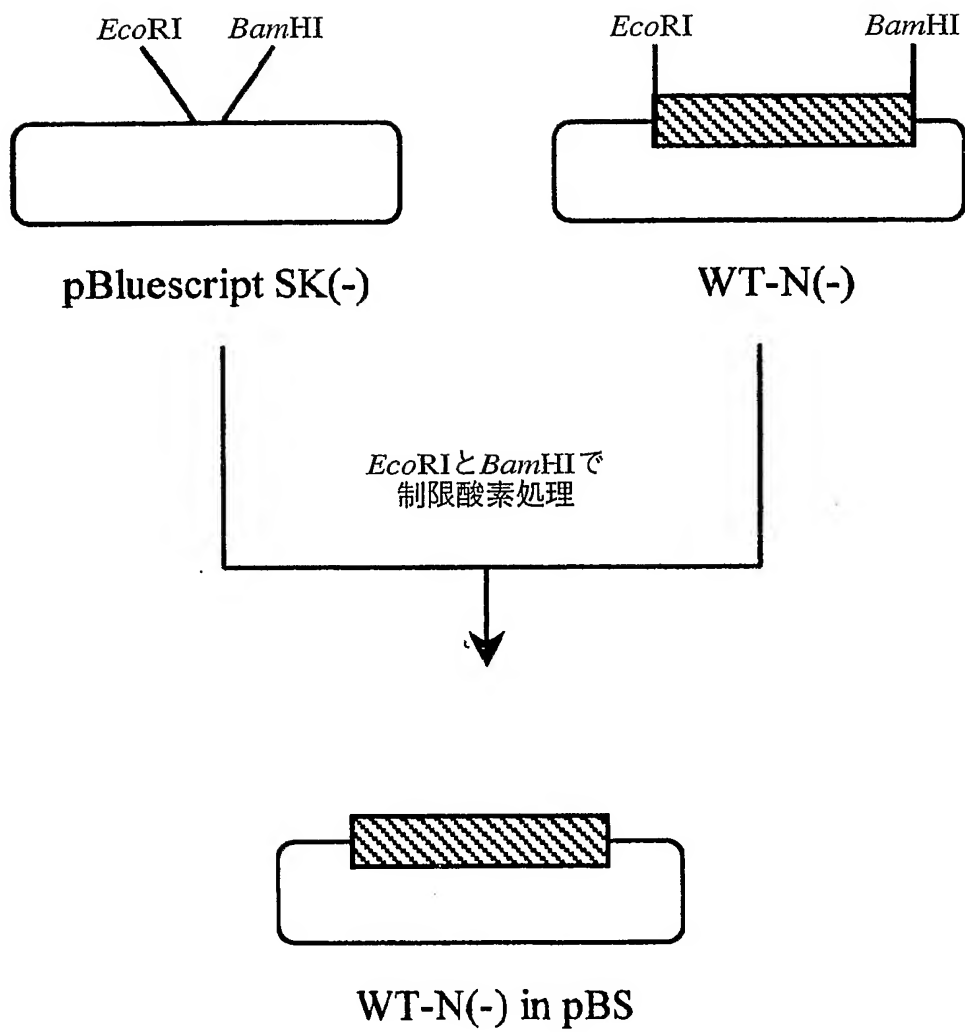


## 第 2 2 図

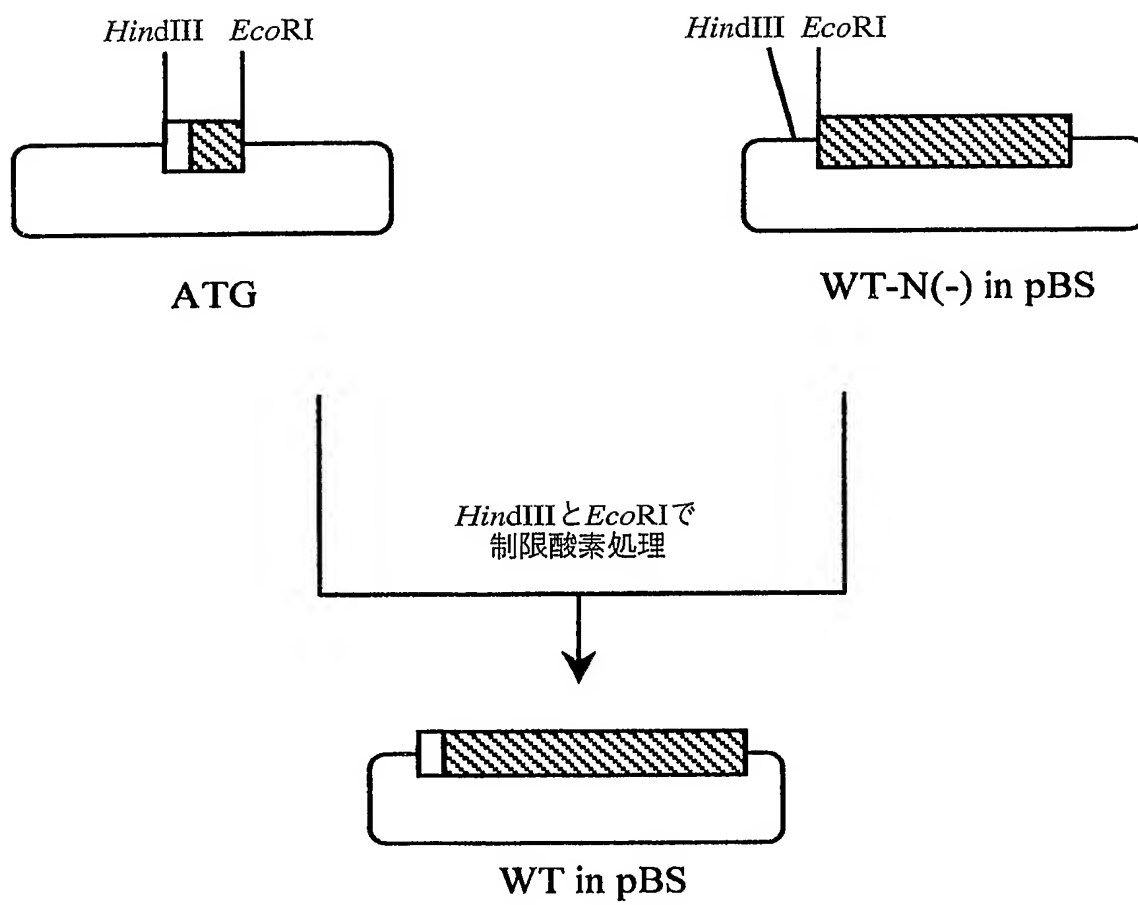




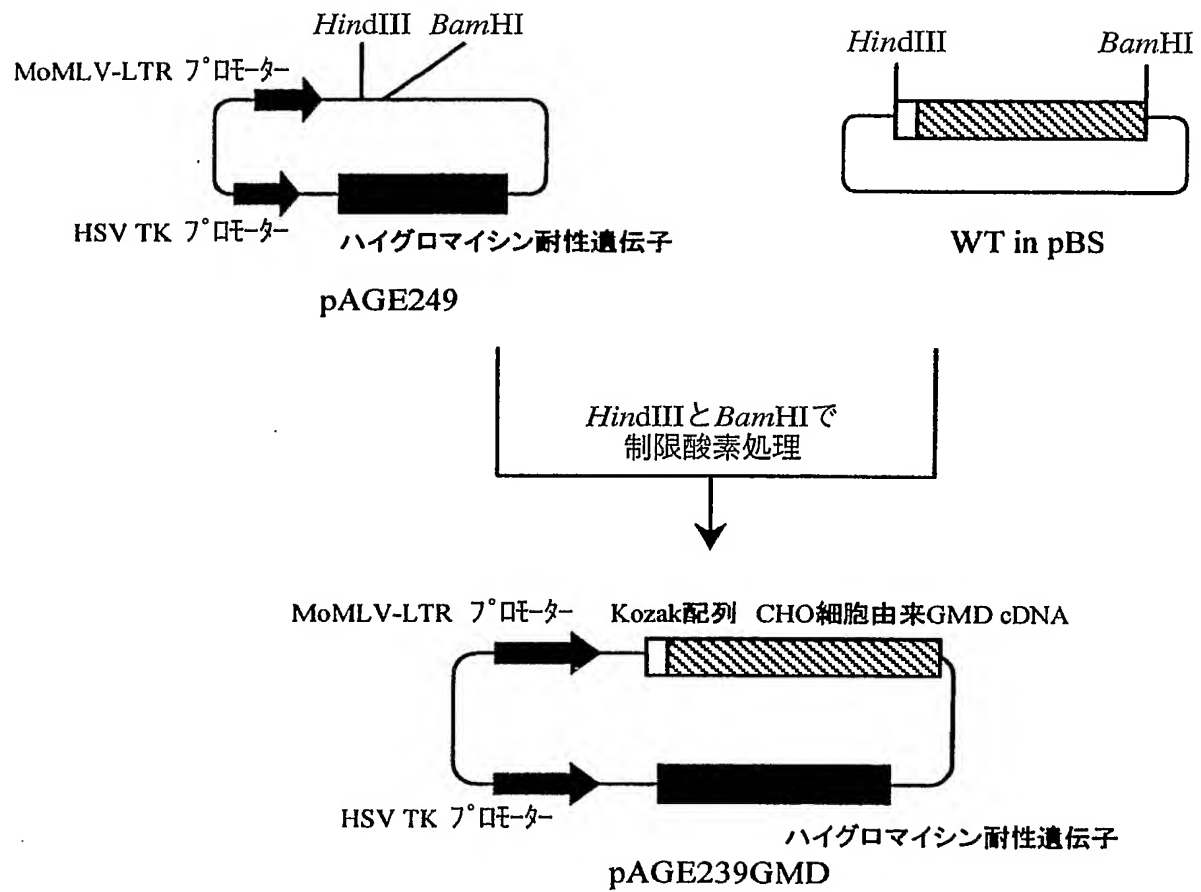
## 第 2 3 図



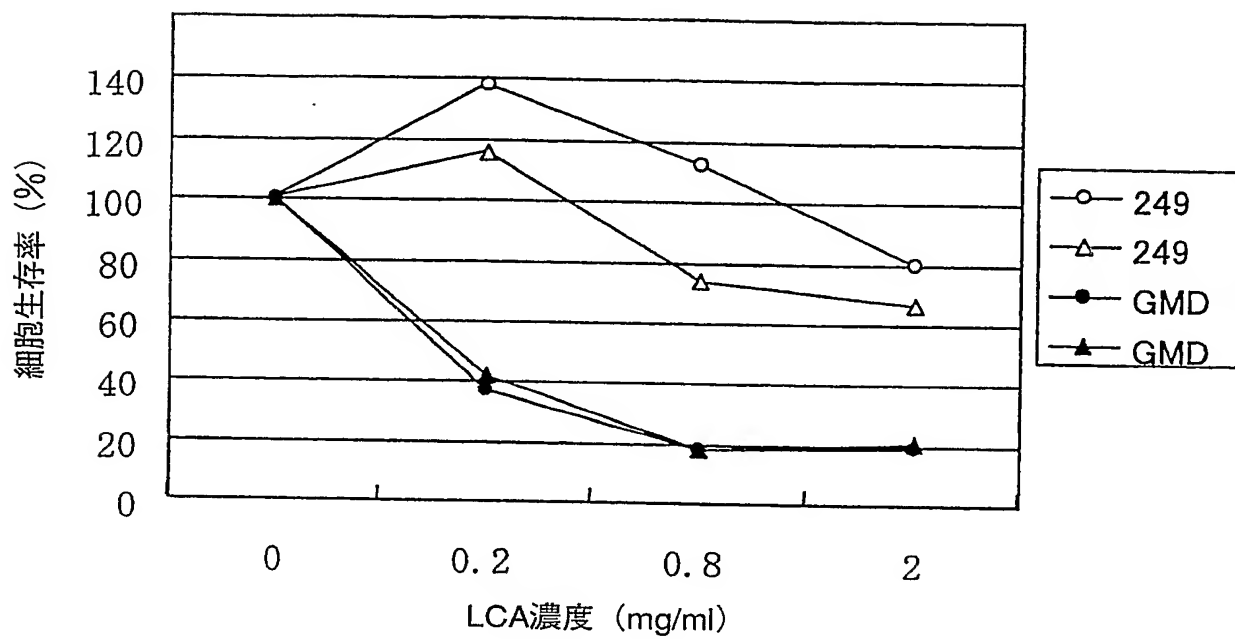
## 第 2 4 図



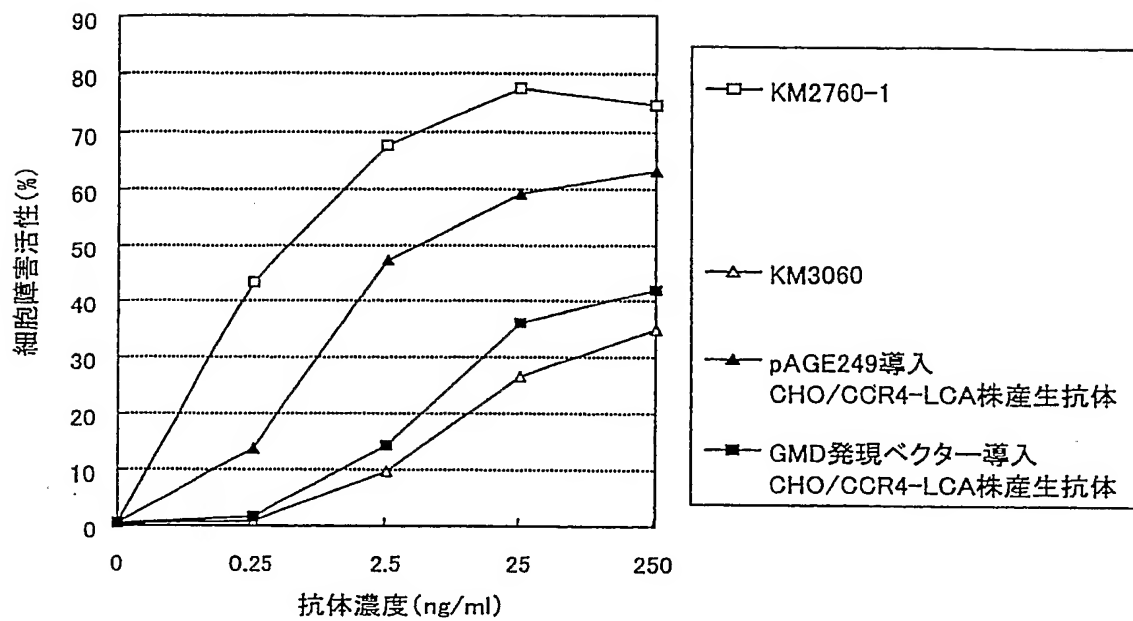
## 第 2 5 図



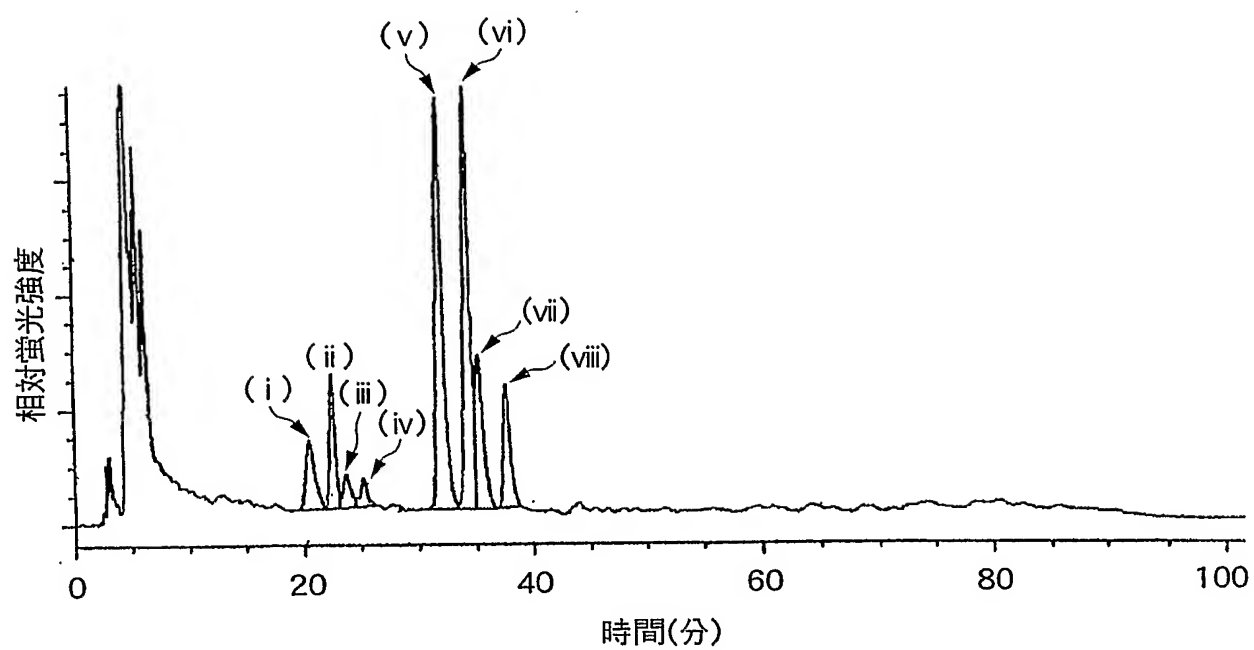
第 2 6 図



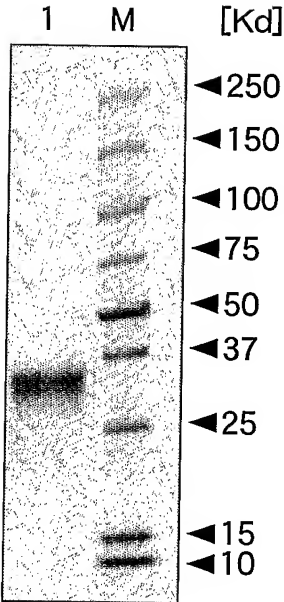
## 第 2 7 図



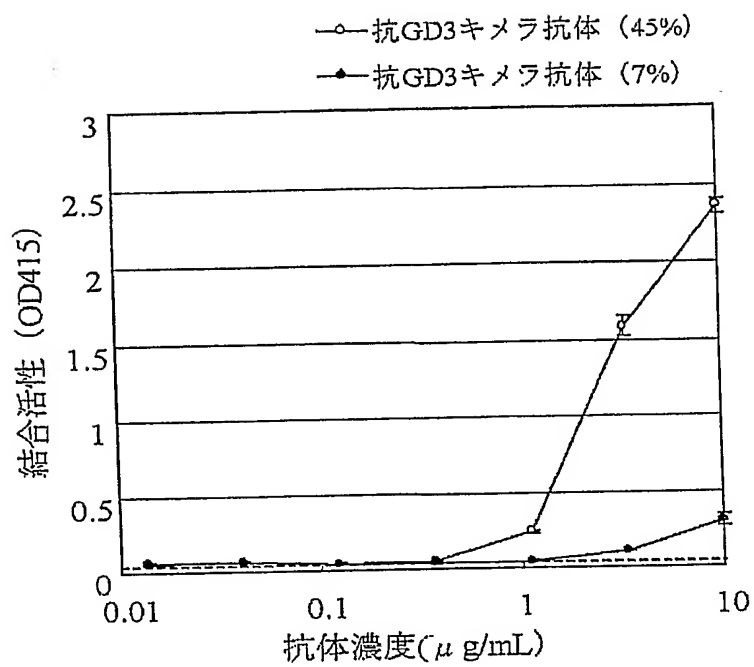
第 28 図



第 2 9 図

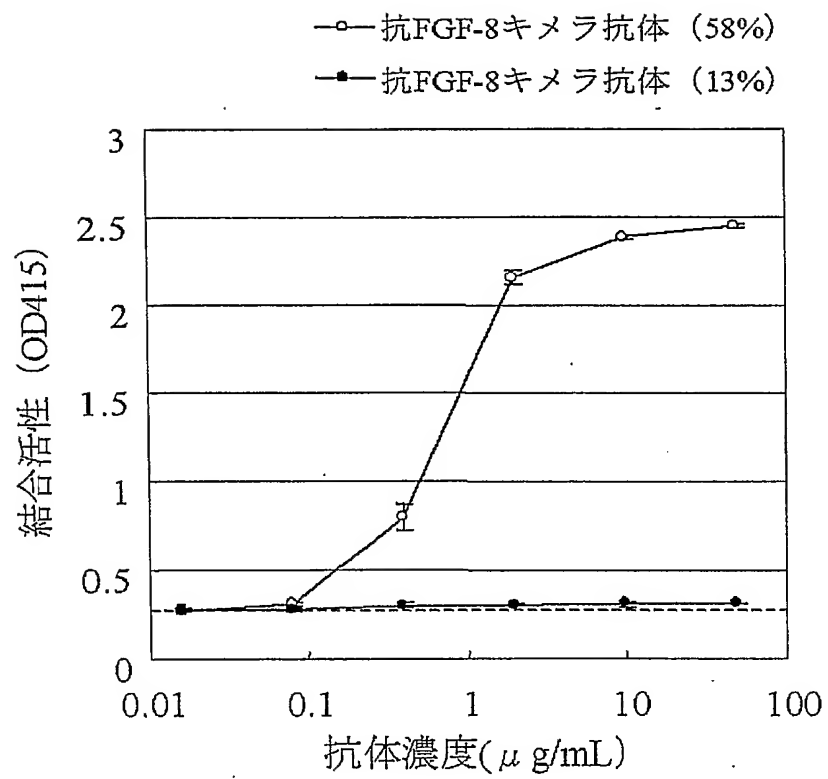


## 第 3 0 図

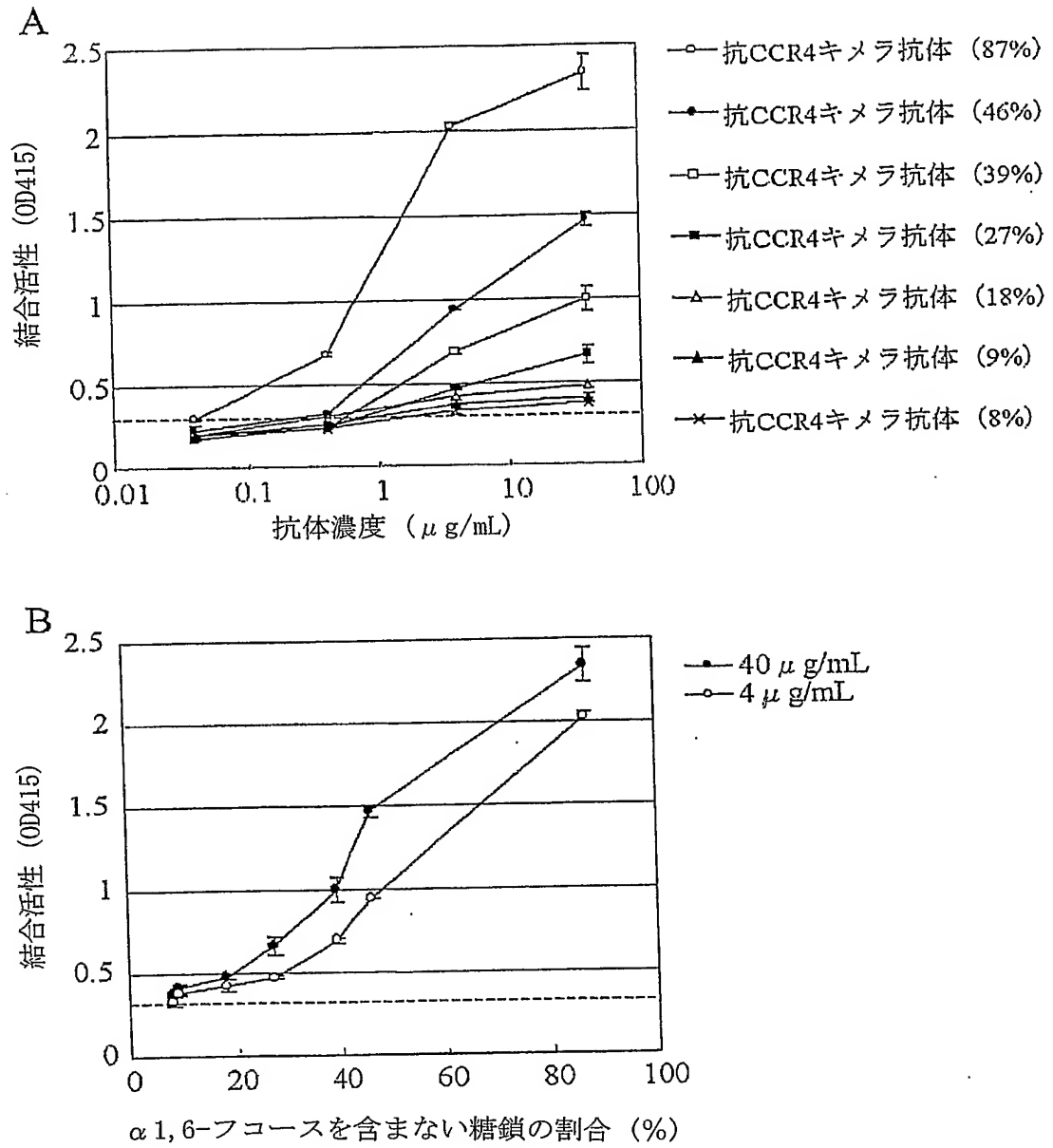




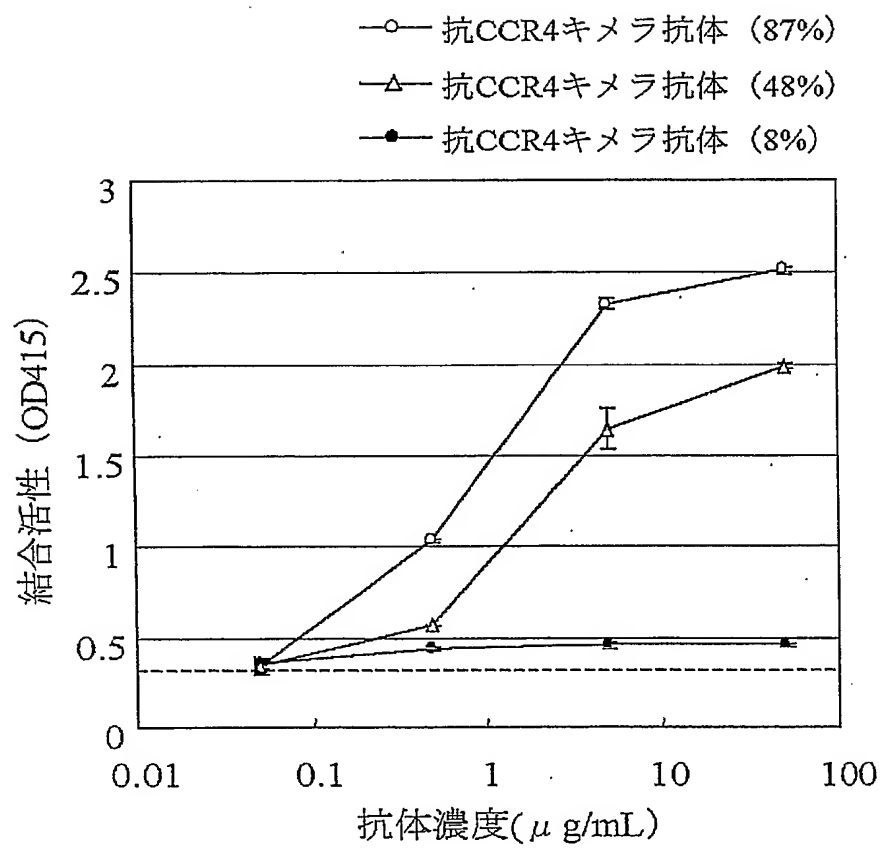
第 3 1 図



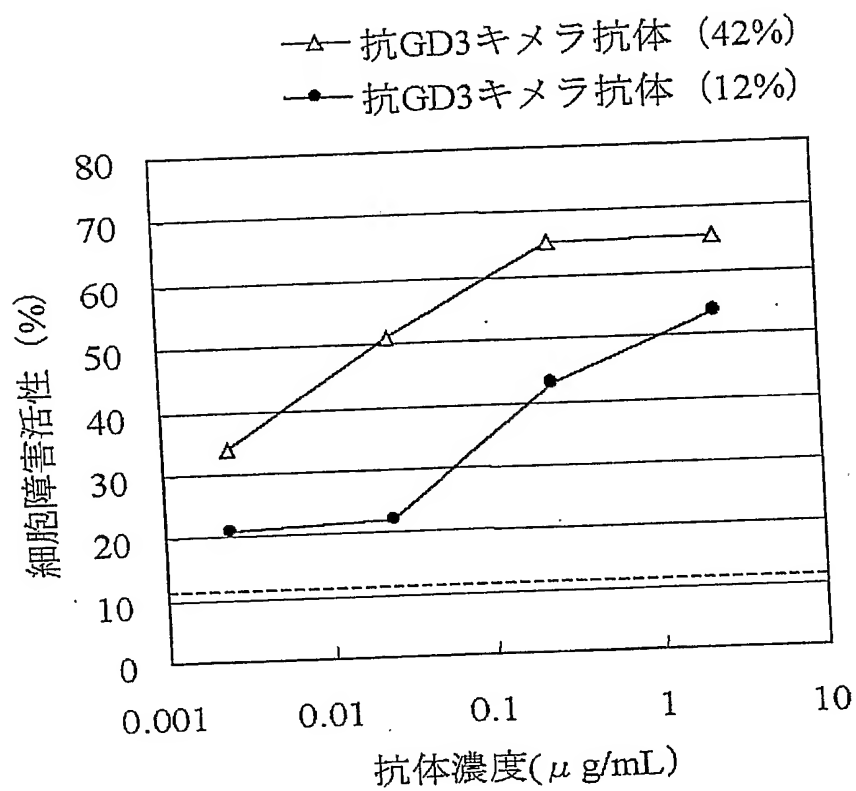
## 第 3 2 図



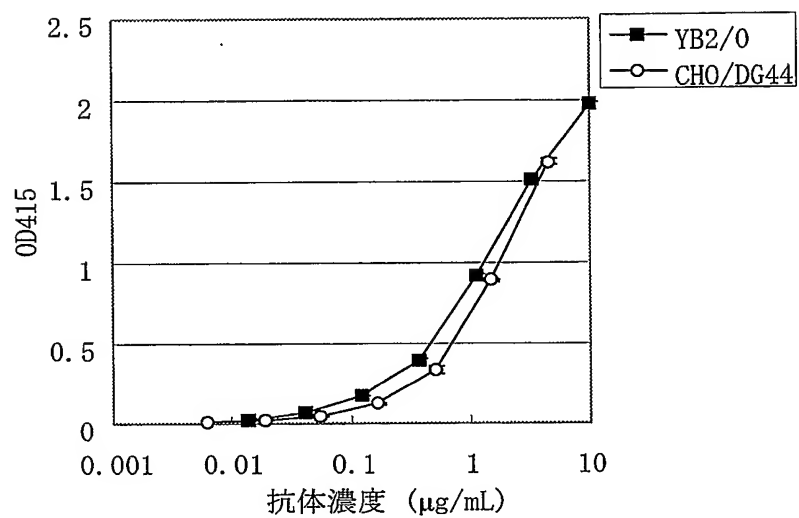
第 3 3 図



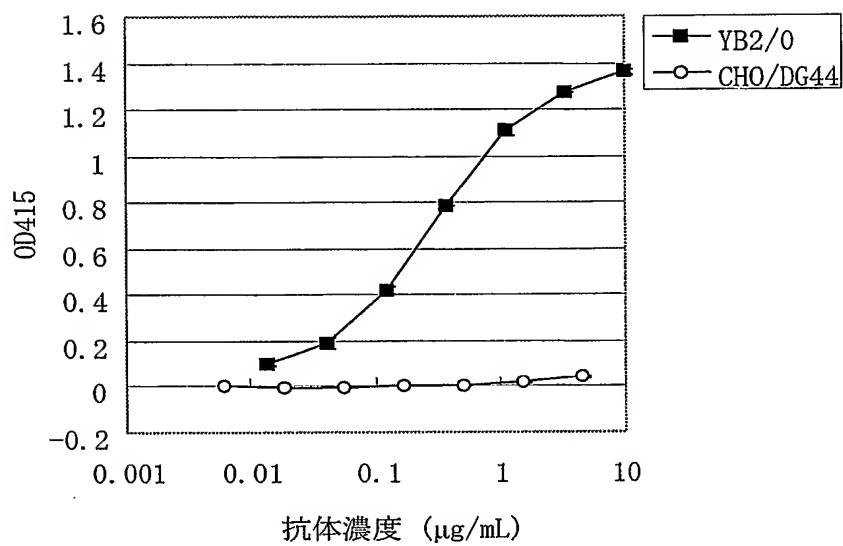
第 3 4 図



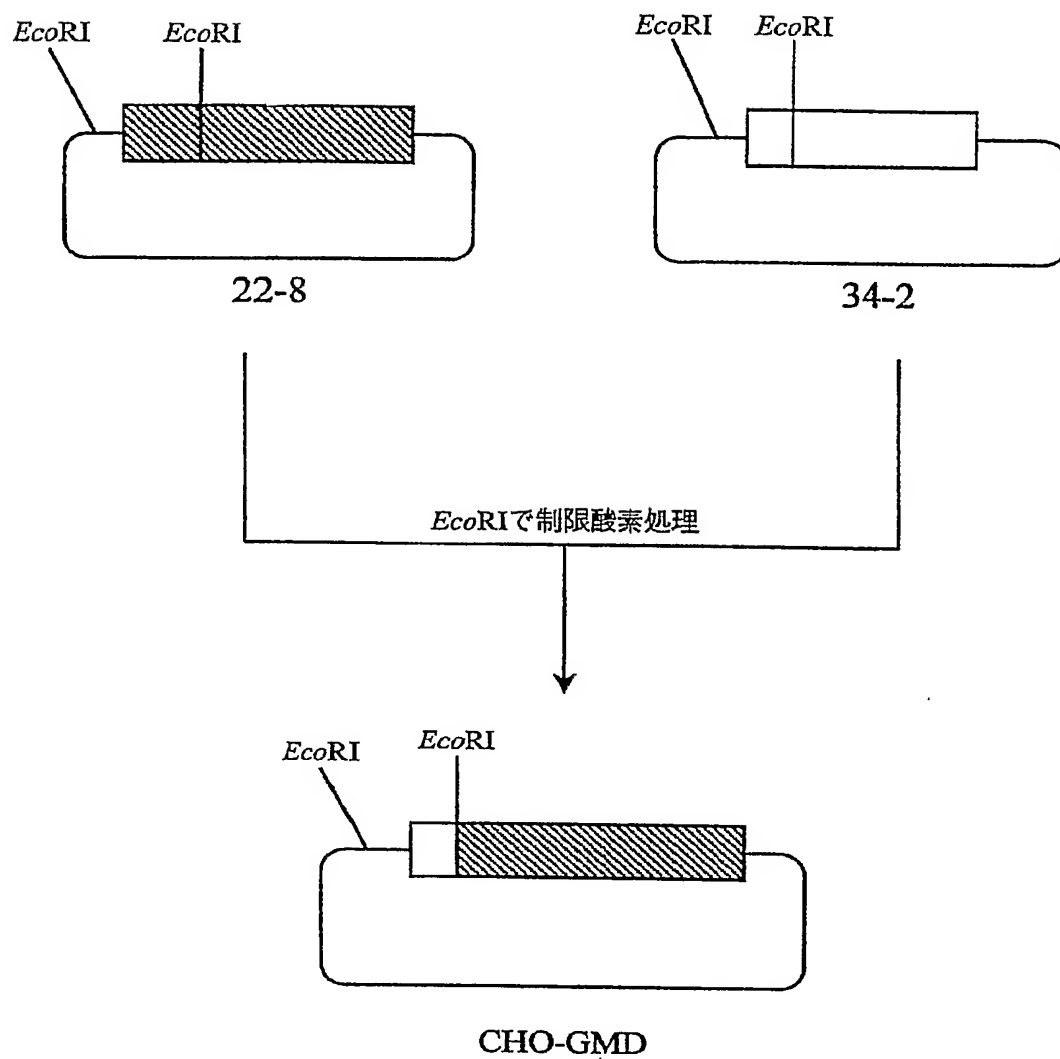
第 3 5 図



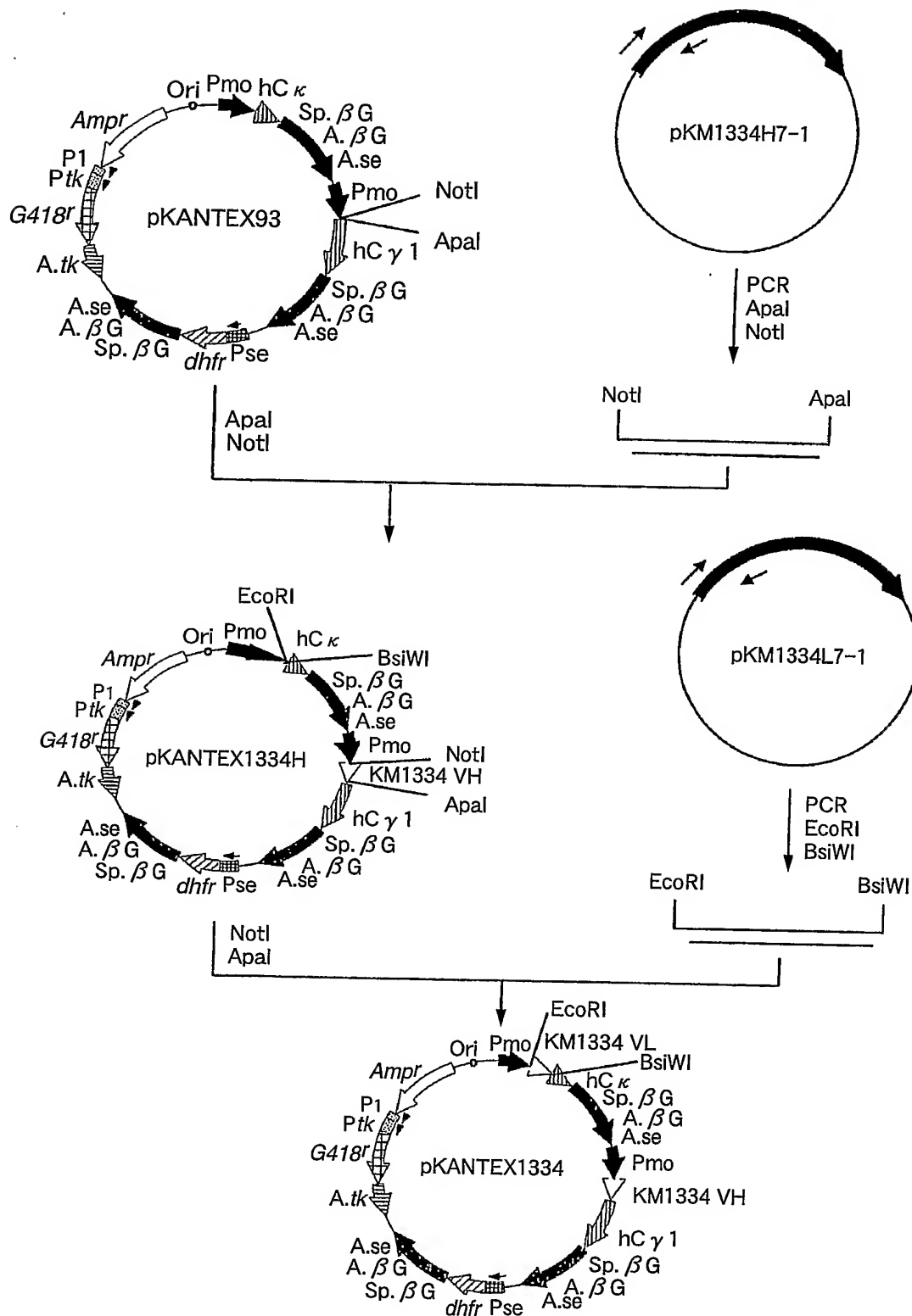
第 3 6 図



## 第 3 7 図



第 38 図





## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Method of enhancing of binding activity of antibody composition to Fcγ receptor IIIa

<130> P044077

<150> P2002-106950

<151> 2002-04-09

<160> 100

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2008

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 1

```
aacagaaact tattttcctg tgtggctaac tagaaccaga gtacaatggt tccaattctt 60
tgagctccga gaagacagaa gggagttgaa actctgaaaa tgcgggcatg gactggttcc 120
tggcggttga ttatgctcat tctttttgcc tgggggacct tattgtttta tataggtggt 180
catttggttc gagataatga ccaccctgac cattctagca gagaactctc caagattctt 240
gcaaagctgg agcgcttaaa acaacaaaat gaagacttga ggagaatggc tgagtctctc 300
cgaataccag aaggccctat tgatcagggg acagctacag gaagagtccg tgttttagaa 360
gaacagcttg ttaaggccaa agaacagatt gaaaattaca agaaacaagc taggaatgat 420
ctgggaaagg atcatgaaat cttaaggagg aggattgaaa atggagctaa agagctctgg 480
ttttttctac aaagtgaatt gaagaaatta aagaaattag aaggaaacga actccaaaga 540
catgcagatg aaattctttt ggatttagga catcatgaaa ggtctatcat gacagatcta 600
tactacctca gtcaaacaga tggagcaggt gagtggcggg aaaaagaagc caaagatctg 660
acagagctgg tccagcggag aataacatat ctgcagaatc ccaaggactg cagcaaagcc 720
agaaagctgg tatgtaatat caacaaggc tgtggctatg gatgtcaact ccatcatgtg 780
gtttactgct tcatgattgc ttatggcacc cagcgaacac tcatcttgga atctcagaat 840
tggcgctatg ctactggagg atgggagact gtgttttagac ctgtaagtga gacatgcaca 900
gacaggtctg gcctctccac tggacactgg tcaggtgaag tgaaggacaa aatgttcaa 960
```

gtggtcgagc tccccattgt agacagcctc catcctcgtc ctccttactt acccttggct 1020  
 gtaccagaag accttgcaga tcgactcctg agagtccatg gtgatcctgc agtgtggtgg 1080  
 gtatcccagt ttgtcaaata cttgatccgt ccacaacctt ggctggaaag ggaaatagaa 1140  
 gaaaccacca agaagcttgg cttcaaacad ccagttattg gagtccatgt cagacgcact 1200  
 gacaaagtgg gaacagaagc agccttccat cccattgagg aatacatggg acacgttgaa 1260  
 gaacattttc agcttctcga acgcagaatg aaagtggata aaaaaagagt gtatctggcc 1320  
 actgatgacc cttctttgtt aaaggaggca aagacaaagt actccaatta tgaattttatt 1380  
 agtgataact ctatttcttg gtcagctgga ctacacaacc gatacacaga aaattcactt 1440  
 cggggcgatga tcctggatat acactttctc tcccaggctg acttccttgt gtgtactttt 1500  
 tcattcccagg tctgtagggg tgcttatgaa atcatgcaaa cactgcatcc tgatgcctct 1560  
 gcaaacttcc attctttaga tgacatctac tattttggag gccaaaatgc ccacaaccag 1620  
 attgcagttt atcctcacca acctcgaaat aaaggaggaaa tcccattgga acctggagat 1680  
 atcattgggtg tggctggaaa ccattggaat ggttactcta aagggtgtcaa cagaaaacta 1740  
 ggaaaaacag gcctgtaccc ttctacaaa gtccgagaga agatagaaac agtcaaatac 1800  
 cctacatata ctgaagctga aaaatagaga tggagtgtaa gagattaaca acagaattta 1860  
 gttcagacca tctcagccaa gcagaagacc cagactaaca tatggttcat tgacagacat 1920  
 gctccgcacc aagagcaagt gggaaccctc agatgctgca ctggtggaac gcctctttgt 1980  
 gaagggtgctc tgtgccctca agcccatg 2008

<210> 2

<211> 1728

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atgcgggcat ggactgggtc ctggcggttg attatgctca ttctttttgc ctgggggacc 60  
 ttgttatttt atataggttg tcatttgggt cgagataatg accaccctga tcactccagc 120  
 agagaactct ccaagattct tgcaaagctt gaacgcttaa aacagcaaaa tgaagacttg 180  
 aggcgaatgg ctgagtctct ccgaatacca gaaggcccca ttgaccaggg gacagctaca 240  
 ggaagagtcc gtgttttaga agaacagctt gttaaggcca aagaacagat tgaaaattac 300  
 aagaaacaag ctagaaatgg tctggggaag gatcatgaaa tcttaagaag gaggattgaa 360  
 aatggagcta aagagctctg gttttttcta caaagcgaac tgaagaaatt aaagcattta 420  
 gaaggaaatg aactccaaag acatgcagat gaaattcttt tggatttagg acaccatgaa 480  
 aggtctatca tgacagatct atactacctc agtcaaacag atggagcagg ggattggcgt 540  
 gaaaaagagg ccaaagatct gacagagctg gtccagcgga gaataacata tctccagaat 600  
 cctaaggact gcagcaaagc caggaagctg gtgtgtaaca tcaataaagg ctgtggctat 660  
 ggttgtcaac tccatcacgt ggtctactgt ttcatgattg cttatggcac ccagcgaaca 720

ctcatcttgg aatctcagaa ttggcgctat gctactggtg gatgggagac tgtgtttaga 780  
 cctgtaagtg agacatgtac agacagatct ggcctctcca ctggacactg gtcaggtgaa 840  
 gtaaattgaca aaaacattca agtggctcgag ctccccattg tagacagcct ccatcctcgg 900  
 cctccttact taccactggc tgttccagaa gaccttgcag accgactcct aagagtccat 960  
 ggtgaccctg cagtgtggtg ggtgtcccag tttgtcaaat acttgattcg tccacaacct 1020  
 tggctggaaa aggaaataga agaagccacc aagaagcttg gcttcaaaca tccagttatt 1080  
 ggagtccatg tcagacgcac agacaaagtg ggaacagaag cagccttcca ccccatcgag 1140  
 gagtacatgg tacacgttga agaacatttt cagcttctcg cagcgagaat gcaagtggat 1200  
 aaaaaaagag tatactctggc tactgatgat cctactttgt taaaggaggc aaagacaaag 1260  
 tactccaatt atgaatttat tagtgataac tctatttctt ggtcagctgg actacacaat 1320  
 cggtacacag aaaattcact tcgggggtgtg atcctggata tacactttct ctcacaggct 1380  
 gactttctag tgtgtacttt ttcatcccag gtctgtcggg ttgcttatga aatcatgcaa 1440  
 accctgcate ctgatgcctc tgcgaacttc cattctttgg atgacatcta ctattttgga 1500  
 ggccaaaatg cccacaatca gattgctgtt tatcctcaca aacctcgaac tgaagaggaa 1560  
 attccaatgg aacctggaga tatcattggt gtggctggaa accattggga tggttattct 1620  
 aaaggtatca acagaaaact tggaaaaaca ggcttatatc cctcctacaa agtccgagag 1680  
 aagatagaaa cagtcaagta tcccacatat cctgaagctg aaaaatag 1728

<210> 3

<211> 9196

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 3

tctagaccag gctgggtctg aactcacaga gaaccacctg cctctgccac ctgagtgtctg 60  
 ggattaaagg tgtgcaccac caccgcccgg cgtaaaatca tatttttgaa tatttgtata 120  
 atttacatta taattgtaag taaaaatttt cagcctattt tgttatacat ttttgcgtaa 180  
 attattcttt tttgaaagtt ttgttgtcca taatagtcta gggaaacata aagttataat 240  
 ttttgtctat gtatttgcac atatatctat ttaatctcct aatgtccagg aaataaatag 300  
 ggtatgtaat agcttcaaca tgttggtatga tagaattttt cagtgtctata taagttgtta 360  
 cagcaaagtg ttattaatc atatgtccat atttcaattt tttatgaatt attaaattga 420  
 atccttaagc tgccagaact agaattttat tttaatcagg aagccccaaa tctgttcatt 480  
 ctttctatat atgtggaaag gtaggcctca ctaactgatt cttcacctgt tttagaacat 540  
 ggtccaagaa tggagttag taagggaagt tacaagtgtg agaaaactcc tagaaaacaa 600  
 gatgagtctt gtgaccttag tttcttttaa aacacaaaat tcttggaatg tgttttcatg 660  
 ttcctcccag gtggatagga gtgagtttat ttcagattat ttattacaac tggctgttgt 720  
 tacttgtttc tatgtcttta tagaaaaaca tatttttttt gccacatgca gcttgtcctt 780

atgattttat acttgtgtga ctcttaactc tcagagtata aattgtctga tgctatgaat 840  
 aaagttggct attgtatgag acttcagccc acttcaatta ttggcttcat tctctcagat 900  
 cccaccacct ccagagtggg aaacaacttg aaccattaaa cagactttag tctttatttg 960  
 aatgatagat ggggatatca gatttatagg cacagggttt tgagaaaggg agaaggtaaa 1020  
 cagtagagtt taacaacaac aaaaagtata ctttgtaaac gtaaaactat ttattaaagt 1080  
 agtagacaag acattaaata ttccctggga ttagtgcttt ttgaattttg ctttcaaata 1140  
 atagtcagtg agtatacccc tccccattc tatatttttag cagaaatcag aataaatggg 1200  
 gtttctggta cattcttttg tagagaattt attttctttg ggtttttgtg catttaaagt 1260  
 caataaaaaat taaggttcag taatagaaaa aaaactctga tttttggaat cccctttctt 1320  
 cagcttttct atttaatctc ttaatgataa tttaatittg gccatgtgg tcaaagtata 1380  
 tagccttgta tatgtaaatg ttttaaccaa cctgccttta cagtaactat ataattttat 1440  
 tctataatat atgacttttc ttccatagct ttagagttgc ccagtcactt taagttacat 1500  
 tttcatatat gttctttgtg ggaggagata attttatttc taagagaatc ctaagcatat 1560  
 tgattgagaa atggcaaaca aaacacataa ttaaagctga taaagaacga acatttggag 1620  
 tttaaaatac atagccaccc taagggttta actgttgta gccttctttt ggaattttta 1680  
 ttagttcata tagaaaaatg gattttatcg tgacatttc atatatgtat ataatatatt 1740  
 tacatcatat ccacctgtaa ttattagtgt ttttaaatat atttgaaaaa ataatgggtc 1800  
 ggtttgatcc atttgaacct ttgatgttt ggtgtgggtg ccaattgggt gatggttatg 1860  
 ataacctttg cttctctaag gttcaagtca gtttgagaat atgtcctcta aaaatgacag 1920  
 gttgcaagtt aagtagtgag atgacagcga gatggagtga tgagaatttg tagaaatgaa 1980  
 ttcaattata ctgagaactt gttttgcttt tagataatga acatatttag ctgaagtaca 2040  
 tagccgaatt gattaattat tcaaagatat aatcttttaa tccctataaa agaggattta 2100  
 cacaacaatt caagaaagat agaattagac ttccagtatt ggagtgaacc atttgttatc 2160  
 aggtagaacc ctaacgtgtg tggttgactt aaagtgttta ctttttacct gatactgggt 2220  
 agctaattgt ctttcagcct cctggccaaa gataccatga aagtcaactt acgttgtatt 2280  
 ctatatctca aacaactcag ggtgtttctt actctttcca cagcatgtag agcccaggaa 2340  
 gcacaggaca agaaagctgc ctccctgtat caccaggaag atctttttgt aagagtcac 2400  
 acagtatacc agagagacta attttgtctg aagcatcatg tgttgaaaca acagaaactt 2460  
 attttcctgt gtggctaact agaaccagag tacaatgttt ccaattcttt gagctccgag 2520  
 aagacagaag ggagttgaaa ctctgaaaat gcgggcatgg actggttcct ggcgttgat 2580  
 tatgtcatt ctttttgcc tggggacctt attgttttat ataggtggc atttggttcg 2640  
 agataatgac caccctgacc attctagcag agaactctcc aagattcttg caaagctgga 2700  
 gcgcttaaaa caacaaaatg aagacttgag gagaatggct gagtctctcc gtaggtttg 2760  
 aaatactcaa ggatttgatg aaatactgtg cttgacctt aggtataggg tctcagtctg 2820  
 ctgttgaaaa atataatttc tacaaccgt ctttgtaaaa ttttaagtat tgtagcagac 2880  
 ttttaaaag tcagtatac atctatatag tcaatatagg ttacatagt tgcaatctta 2940  
 ttttgcataat gaatcagtat atagaagcag tggcatttat atgcttatgt tgcatttaca 3000  
 attatgttta gacgaacaca aactttatgt gatttggatt agtgcatt aaattttttt 3060

attctatgga ctacaacaga gacataaatt ttgaaaggct tagttactct taaattctta 3120  
 tgatgaaaag caaaaattca ttgttaaata gaacagtgc tccggaatgt gggtaattat 3180  
 tgccatattt ctagtctact aaaaattgtg gcataactgt tcaaagtcac cagttgtttg 3240  
 gaaagccaaa gtctgattta aatggaaaac ataaacaatg atatctattt ctagatacct 3300  
 ttaacttgca gttactgagt ttacaagttg tctgacaact ttggattctc ttacttcata 3360  
 tctaagaatg atcatgtgta cagtgcctac tgtcacttta aaaaactgca gggctagaca 3420  
 tgcagatatg aagactttga cattagatgt ggtaattggc actaccagca agtggattta 3480  
 agatacagct gaatatatta ctttttgagg aacataattc atgaatggaa agtggagcat 3540  
 tagagaggat gccttctggc tctccacac cactgtttgc atccattgca tttcacactg 3600  
 cttttagaac tcagatgttt catatggtat attgtgtaac tcaccatcag ttttatcttt 3660  
 aaatgtctat ggatgataat gttgtatgtt aacactttta caaaaacaaa tgaagccata 3720  
 tcctcgggtg gagttgtgat ggtggtaatt gtcacaatag gattattcag caaggaacta 3780  
 agtcagggac aagaagtggg cgatactttg ttggattaaa tcattttact ggaagttcat 3840  
 cagggagggt tatgaaagt gtggtctttg aactgaaatt atatgtgatt cattattctt 3900  
 gatttaggcc ttgctaatag taactatcat ttattgggaa tttgtcatat gtgccaat 3960  
 gtcatgggcc agacagcgtg tttactgaa tttctagata tctttatgag attctagtac 4020  
 tgttttcagc cattttacag atgaagaatc ttaaaaaatg ttaaataatt tagtttgccc 4080  
 aagattatac gttaacaaat ggtagaacct tctttgaatt ctggcagtat ggctacacag 4140  
 tccgaactct tatcttccca agctgaaaac agaaaaagca atgaccacaga aaattttatt 4200  
 taaaagtctc aggagagact tcccatcctg agaagatctc ttttcccttt tataatttag 4260  
 gctcctgaat aatcactgaa tttctccat gttccatcta tagtactgtt atttctgttt 4320  
 tccttttttc ttaccacaaa gtatcttgtt ttgtctgtat gaaagaaaat gtgttattgt 4380  
 aatgtgaaat tctctgtccc tgcagggtcc cacatccgcc tcaatcccaa ataaacacac 4440  
 agaggctgta ttaattatga aactgttggc cagttggcta gggcttctta ttggctagct 4500  
 ctgtcttaat tattaacca taactactat tgtaagtatt tccatgtggc cttatcttac 4560  
 caaggaaagg gtccaggac ctcttactcc tctggcgtgt tggcagtga gagagagag 4620  
 cgatttccca tttgtctctg cttatcttct gattctgctc agctatgtca cttcctgcct 4680  
 ggccaatcag ccaatcagtg ttttattcat tagccaataa aagaaacatt tacacagaag 4740  
 gacttcccc atcatgttat ttgtatgagt tcttcagaaa atcatagtat cttttaatac 4800  
 taatttttat aaaaaattaa ttgtattgaa aattatgtgt atatgtgtct gtgtgtcgat 4860  
 ttgtgtcat aagtagcatg gagtgcagaa gagggaaatca gatcttttt taagggacaa 4920  
 agagtttatt cagattacat ttaaggtga taatgtatga ttgcaagggt atcaacatgg 4980  
 cagaaatgtg aagaagctgg tcacattaca tccagagtca agagtagaga gcaatgaatt 5040  
 gatgcatgca ttctgtgtct cagctcactt ttcttgagc tgagctgatt gtaagccatc 5100  
 tgatgtcttt gctgggaact aactcaaagg caagttcaaa acctgttctt aagtataagc 5160  
 catctctcca gtccctcata tggctcttta agacactttc tttatattct tgtacataga 5220  
 aattgaattc ctaacaactg cattcaaatt acaaaatagt ttttaaagc tgatataata 5280  
 aatgtaaata caatctagaa cttttttata aataagcata ttaactcagt aaaaataaat 5340

gcatggttat tttccttcat tagggaagta tgtctcccca ggctgttctc tagattctac 5400  
 tagtaatgct gtttgacac catccacagg ggttttatit taaagctaag acatgaatga 5460  
 tggacatgct tgtagcatt tagacttttt tccttactat aattgagcta gtatttttgt 5520  
 gctcagtttg atatctgtta attcagataa atgtaatagt aggtaatttc tttgtgataa 5580  
 aggcatataa attgaagttg gaaaacaaaa gcctgaaatg acagttttta agattcagaa 5640  
 caataatttt caaaagcagt taccacactt tccaaataca atctgcagtt ttcttgatat 5700  
 gtgataaatt tagacaaaga aatagcacat tttaaaatag ctattttactc ttgatttttt 5760  
 tttcaaatit aggctagtgc actagtgttg tgtaagggtta tggctgcaaa catctttgac 5820  
 tcttggttag ggaatccagg atgatttacg tgtttgcca aaatcttggt ccattctggg 5880  
 tttcttctct atctaggtag ctagcacaag ttaaagggtg ggtagtattg gaaggctctc 5940  
 aggtatataat ttctatatc tgtatttttt tcctctgtca tatatttgct ttctgtttta 6000  
 ttgattttcta ctggttagttt gatacttact ttcttacct ttctttggga tttattttgc 6060  
 tgttctaaga tttcttagca agttcatatc actgatttta acagttgctt cttttgtaat 6120  
 atagaactgaa tgcccttat ttgaaatgct tgggatcaga aactcagatt tgaacttttc 6180  
 ttttttaata tttccatcaa gtttaccagc tgaatgtcct gatccaagaa tatgaaatct 6240  
 gaaatgcttt gaaatctgaa acttttagag tgataaagct tccctttaaa ttaatttggtg 6300  
 ttctatatit tttgacaatg tcaacctttc attgttatcc aatgagtga catattttca 6360  
 atttttttgt ttgatctgtt atattttgat ctgaccatat ttataaaatt ttatttaatt 6420  
 tgaatgttg gctgttactt atctttatta ttatttttg ttattttcta gccaaatgaa 6480  
 atttatattct gtattatttt agtttgaatt ttactttgtg gcttagtaac tgcctttgt 6540  
 tggatgaatgc ttaagaaaaa cgtgtggtct actgatattg gttctaattc tatatagcat 6600  
 gttgtttgtt aggtagttga ttatgtggt cagattgtct tgagtttatg caaatgtaaa 6660  
 atatttagat gcttgttttg ttgtctaaga acaagtatg cttgtgtct cctatcggtt 6720  
 ctggtttttc cattcatctc ttcaagctgt tttgtgtgtt gaatactaac tccgtactat 6780  
 ctgtttttct gtgaattaac cccttttcaa aggtttcttt tcttttttt ttttaaggac 6840  
 aacaagtta ttacagattac attttaagct gataatgtat gattgcaagg ttatcaacat 6900  
 ggcagaaatg tgaagaagct aggcacatta catccacatg gactcaagag cagagagcag 6960  
 tgaattaatg catgcattcc tgtggtcagc tcacttttcc tattcttaga tagtctagga 7020  
 tcataaacct ggggaatagt gctaccacaa tgggcataat cacttacttc agttcatgca 7080  
 atcaaccaag gcacatccac aggaaaaaact gatttagaca acctctcatt gagactcttc 7140  
 ccagatgatt agactgtgtc aagttgacaa ttaaaactat cacacctgaa gccatcacta 7200  
 gtaaatataa tgaaatgtt gattatcacc ataattcatc tgtatccctt tgttattgta 7260  
 gattttgtga agttcctatt caagtccctg ttcccttctt aaaaacctgt tttttagtta 7320  
 aataggtttt ttagtgttcc tgtctgtaaa tactttttta aagttagata ttattttcaa 7380  
 gtatgttctc ccagtctttg gcttgatttt tcatcccttc aatacatata tttttgtaat 7440  
 ttattttttt tatttaaat agaaacaaag ctgcttttac atgtcagctc cagttccctc 7500  
 tccctccct cctccctgc tcccaccta agcccaatt ccaactcct tcttctcccc 7560  
 aggaagggtg aggccctcca tgggggaaat cttcaatgtc tgtcatatca tttggagcag 7620

```

ggcctagacc ctccccagtg tgtctaggct gagagagtat ccctctatgt ggagagggct 7680
cccaaagttc atttgtgtac taggggtaaa tactgatcca ctatcagtgg ccccatagat 7740
tgtccggacc tccaaactga ctccctcctt caggagagtct ggaacagttc tatgctggtt 7800
tcccagatat cagtctgggg tccatgagca accccttggt caggtcagtt gtttctgtag 7860
gtttccccag ccggtcttg acccctttgc tcatcacttc tccctctctg caactggatt 7920
ccagagttca gtcagtgtt tagctgtggg tgtctgcata tgcttccatc agctactgga 7980
tgagggtctt aggatggcat ataaggtagt catcagtcctc attatcagag aagggtttt 8040
aaggtagcct cttgattatt gcttagattg ttagttgggg tcaaccttgt aggtctctgg 8100
acagtacag aattctcttt aaacctataa tggctccctc tgtggtggta tcccttttct 8160
tgctctcatc cgttccctcc ctgactagat ctccctgctc cctcatgtcc tccctcccc 8220
tccccttctc cccttctctt tcttctaact ccctctcccc tccaccacg atccccatta 8280
gcttatgaga tcttgtcctt attttagcaa aacctttttg gctataaaat taattaattt 8340
aatatgctta tatcaggttt attttgcta gtatttgtat gtgtttgggt agtgttttta 8400
accttaattg acatgtatcc ttatatattg acacagattt aaatatattg agttttttt 8460
ttttttttt tttaaagattt atttattttt tatgtcttct gcctgcatgc cagaagagg 8520
caccagatct cattcaaggt ggttgtgagc caccatgtgg ttgctgggaa ttgaaactcag 8580
gacctctgga agaacagtca gtgctcttaa ccgctgagcc atctctccag cccctgaagt 8640
gtttctttta aagaggatag cagtgcata ttttccctt tgaccaatga ctctacctt 8700
actgaattgt tttagccatt tatatgtaat gctgttacca ggtttacatt ttcttttctc 8760
ttgctaaatt tcttccctgt ttgtctcatc tcttattttt gtctgttgga ttatataggc 8820
ttttattttt ctgtttttac agtaagttat atcaaattaa aattatttta tggaatgggt 8880
gtgttgacta catgtatgtc tgtgcacat gtgctgacct ggtcttgcc agaagaaggt 8940
gtcatattct ctgaaactgg tattgtggat gttacgaact gccatagggt gctaggaatc 9000
aaaccccagc tcctctggaa aagcagccac tgctctgagc cactgagtc tctcttcaag 9060
cagggtgatgc caacttttaa tggttaccag tggataagag tgcttgtatc tctagacccc 9120
atgaaaattt atgcattgct atatgggctt gtcacttcag catttgtgtga cagagacagg 9180
aggatcccaa gagctc

```

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

actcatcttg gaatctcaga attgg

25

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

cttgaccgtt tctatcttct ctcg

24

<210> 6

<211> 979

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 6

actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactgga ggatgggaga ctgtgttttag 60  
 acctgtaagt gagacatgca cagacaggtc tggcctctcc actggacact ggtcaggtga 120  
 agtgaaggac aaaaatgttc aagtggtcga gctccccatt gtagacagcc tccatcctcg 180  
 tcctccttac ttacccttgg ctgtaccaga agaccttgca gatcgactcc tgagagtcca 240  
 tgggtgatcct gcagtgtggt gggatatcca gtttgtcaaa tacttgatcc gtccacaacc 300  
 ttggctggaa agggaaatag aagaaaccac caagaagctt ggcttcaaac atccagttat 360  
 tggagtccat gtcagacgca ctgacaaagt gggaacagaa gcagccttcc atcccattga 420  
 ggaatacatg gtacacgttg aagaacattt tcagcttctc gaacgcagaa tgaaagtgga 480  
 taaaaaaaga gtgtatctgg ccactgatga cccttctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540  
 gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600  
 ccgatacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacacttcc tctcccaggc 660  
 tgacttcctt gtgtgtactt tttcatccca ggtctgtagg gttgcttatg aaatcatgca 720  
 aacactgcat cctgatgcct ctgcaaaactt ccattcttta gatgacatct actattttgg 780  
 aggccaaaat gccacaacc agattgcagt ttatcctcac caacctcgaa ctaaagagga 840  
 aatccccatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattgga atggttactc 900  
 taaagggtgc aacagaaaac taggaaaaac aggctgtac ccttcctaca aagtccgaga 960  
 gaagatagaa acggtcaag 979



&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 979

&lt;212&gt; DNA

<213> *Rattus norvegicus*

&lt;400&gt; 7

```

actcatcttg gaatctcaga attggcgcta tgctactggt ggatgggaga ctgtgttttag 60
acctgtaagt gagacatgca cagacagatc tggcctctcc actggacact ggtcaggtga 120
agtgaatgac aaaaatattc aagtgggtga gctccccatt gtagacagcc ttcacacctcg 180
gcctccttac ttaccactgg ctgttcacaga agaccttgca gatcgactcg taagagtcca 240
tgggtgatcct gcagtgtggt ggggtgtcca gtctgtcaaa tatttgattc gtccacaacc 300
ttggctagaa aaggaaatag aagaagccac caagaagctt ggcttcaaac atccagtcac 360
tggagtccat gtcagacgca cagacaaagt gggaacagag gcagccttcc atcccatcga 420
agagtacatg gtacatgttg aagaacattt tcagcttctc gcacgcagaa tgcaagtgga 480
taaaaaaaga gtatatctgg ctaccgatga ccctgctttg ttaaaggagg caaagacaaa 540
gtactccaat tatgaattta ttagtgataa ctctatttct tggtcagctg gactacacaa 600
tcggtacaca gaaaattcac ttcggggcgt gatcctggat atacactttc tctctcaggc 660
tgacttccta gtgtgtactt tttcatccca ggtctgtcgg gttgcttatg aaatcatgca 720
aaccctgcat cctgatgcct ctgcaaaact ccactcttta gatgacatct actatcttgg 780
aggccaaaat gcccacaacc agattgccgt ttatcctcac aaacctcgaa ctgatgagga 840
aattccaatg gaacctggag atatcattgg tgtggctgga aaccattggg atggttattc 900
taaagggtgc aacagaaaac ttggaaaaac aggcttatat ccctcctaca aagtccgaga 960
gaagatagaa acggtcaag                                     979

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 8

```

aagtataagc ttacatggat gacgatatcg ctgcgctcgt

```

40

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

atttaactgc aggaagcatt tgcggtggac gatggagggg

40

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

atttaaggta ccgaagcatt tgcggtgcac gatggagggg

40

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11

ctccaattat gaatttatta gtg

23

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12

ggatgtttga agccaagctt cttgg

25

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

gtccatggtg atcctgcagt gtgg

24

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

caccaatgat atctccaggt tcc

23

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

gatatcgctg cgctcggtgt cgac

24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

caggaaggaa ggctggaaaa gagc

24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

gatatcgctg cgctcgctgt cgac

24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 18

caggaaggaa ggctggaaga gagc

24

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cricetulus griseus

&lt;400&gt; 19

Met	Gly	Glu	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Arg	Ile	Leu	Val	Thr	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15	
Gly	Leu	Val	Gly	Arg	Ala	Ile	Gln	Lys	Val	Val	Ala	Asp	Gly	Ala	Gly
			20					25					30		
Leu	Pro	Gly	Glu	Glu	Trp	Val	Phe	Val	Ser	Ser	Lys	Asp	Ala	Asp	Leu
			35				40					45			
Thr	Asp	Ala	Ala	Gln	Thr	Gln	Ala	Leu	Phe	Gln	Lys	Val	Gln	Pro	Thr
	50					55				60					
His	Val	Ile	His	Leu	Ala	Ala	Met	Val	Gly	Gly	Leu	Phe	Arg	Asn	Ile
65				70						75				80	
Lys	Tyr	Asn	Leu	Asp	Phe	Trp	Arg	Lys	Asn	Val	His	Ile	Asn	Asp	Asn
			85						90				95		
Val	Leu	His	Ser	Ala	Phe	Glu	Val	Gly	Thr	Arg	Lys	Val	Val	Ser	Cys
			100					105					110		
Leu	Ser	Thr	Cys	Ile	Phe	Pro	Asp	Lys	Thr	Thr	Tyr	Pro	Ile	Asp	Glu
		115				120					125				
Thr	Met	Ile	His	Asn	Gly	Pro	Pro	His	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Tyr	Ser
	130				135						140				
Tyr	Ala	Lys	Arg	Met	Ile	Asp	Val	Gln	Asn	Arg	Ala	Tyr	Phe	Gln	Gln
145				150						155				160	
His	Gly	Cys	Thr	Phe	Thr	Ala	Val	Ile	Pro	Thr	Asn	Val	Phe	Gly	Pro
			165					170					175		
His	Asp	Asn	Phe	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	His	Val	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile
		180						185					190		
His	Lys	Val	His	Leu	Ala	Lys	Ser	Asn	Gly	Ser	Ala	Leu	Thr	Val	Trp
		195						200					205		

Gly Thr Gly Lys Pro Arg Arg Gln Phe Ile Tyr Ser Leu Asp Leu Ala  
 210 215 220  
 Arg Leu Phe Ile Trp Val Leu Arg Glu Tyr Asn Glu Val Glu Pro Ile  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Ser Val Gly Glu Glu Asp Glu Val Ser Ile Lys Glu Ala Ala  
 245 250 255  
 Glu Ala Val Val Glu Ala Met Asp Phe Cys Gly Glu Val Thr Phe Asp  
 260 265 270  
 Ser Thr Lys Ser Asp Gly Gln Tyr Lys Lys Thr Ala Ser Asn Gly Lys  
 275 280 285  
 Leu Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Phe Arg Phe Thr Pro Phe Lys Gln Ala  
 290 295 300  
 Val Lys Glu Thr Cys Ala Trp Phe Thr Asp Asn Tyr Glu Gln Ala Arg  
 305 310 315 320  
 Lys

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 590

&lt;212&gt; PRT

<213> *Cricetulus griseus*

&lt;400&gt; 20

Met Ala Ser Leu Arg Glu Ala Ser Leu Arg Lys Leu Arg Arg Phe Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Met Arg Gly Lys Pro Val Ala Thr Gly Lys Phe Trp Asp Val Val  
 20 25 30  
 Val Ile Thr Ala Ala Asp Glu Lys Gln Glu Leu Ala Tyr Lys Gln Gln  
 35 40 45  
 Leu Ser Glu Lys Leu Lys Arg Lys Glu Leu Pro Leu Gly Val Asn Tyr  
 50 55 60  
 His Val Phe Thr Asp Pro Pro Gly Thr Lys Ile Gly Asn Gly Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Leu Cys Ser Leu Gln Cys Leu Glu Ser Leu Tyr Gly Asp Lys Trp  
 85 90 95  
 Asn Ser Phe Thr Val Leu Leu Ile His Ser Gly Gly Tyr Ser Gln Arg  
 100 105 110  
 Leu Pro Asn Ala Ser Ala Leu Gly Lys Ile Phe Thr Ala Leu Pro Leu

115	120	125
Gly Glu Pro Ile Tyr Gln Met Leu Asp Leu Lys Leu Ala Met Tyr Met		
130	135	140
Asp Phe Pro Ser Arg Met Lys Pro Gly Val Leu Val Thr Cys Ala Asp		
145	150	155
Asp Ile Glu Leu Tyr Ser Ile Gly Asp Ser Glu Ser Ile Ala Phe Glu		
165	170	175
Gln Pro Gly Phe Thr Ala Leu Ala His Pro Ser Ser Leu Ala Val Gly		
180	185	190
Thr Thr His Gly Val Phe Val Leu Asp Ser Ala Gly Ser Leu Gln His		
195	200	205
Gly Asp Leu Glu Tyr Arg Gln Cys His Arg Phe Leu His Lys Pro Ser		
210	215	220
Ile Glu Asn Met His His Phe Asn Ala Val His Arg Leu Gly Ser Phe		
225	230	235
Gly Gln Gln Asp Leu Ser Gly Gly Asp Thr Thr Cys His Pro Leu His		
245	250	255
Ser Glu Tyr Val Tyr Thr Asp Ser Leu Phe Tyr Met Asp His Lys Ser		
260	265	270
Ala Lys Lys Leu Leu Asp Phe Tyr Glu Ser Val Gly Pro Leu Asn Cys		
275	280	285
Glu Ile Asp Ala Tyr Gly Asp Phe Leu Gln Ala Leu Gly Pro Gly Ala		
290	295	300
Thr Ala Glu Tyr Thr Lys Asn Thr Ser His Val Thr Lys Glu Glu Ser		
305	310	315
His Leu Leu Asp Met Arg Gln Lys Ile Phe His Leu Leu Lys Gly Thr		
325	330	335
Pro Leu Asn Val Val Val Leu Asn Asn Ser Arg Phe Tyr His Ile Gly		
340	345	350
Thr Thr Glu Glu Tyr Leu Leu His Phe Thr Ser Asn Gly Ser Leu Gln		
355	360	365
Ala Glu Leu Gly Leu Gln Ser Ile Ala Phe Ser Val Phe Pro Asn Val		
370	375	380
Pro Glu Asp Ser His Glu Lys Pro Cys Val Ile His Ser Ile Leu Asn		
385	390	395
Ser Gly Cys Cys Val Ala Pro Gly Ser Val Val Glu Tyr Ser Arg Leu		
405	410	415
Gly Pro Glu Val Ser Ile Ser Glu Asn Cys Ile Ile Ser Gly Ser Val		





<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

taaatagaat tcggcatcat gtggcagctg ct

32

<210> 23

<211> 575

<212> PRT

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 23

Met	Arg	Ala	Trp	Thr	Gly	Ser	Trp	Arg	Trp	Ile	Met	Leu	Ile	Leu	Phe
1				5					10					15	
Ala	Trp	Gly	Thr	Leu	Leu	Phe	Tyr	Ile	Gly	Gly	His	Leu	Val	Arg	Asp
			20					25					30		
Asn	Asp	His	Pro	Asp	His	Ser	Ser	Arg	Glu	Leu	Ser	Lys	Ile	Leu	Ala
		35					40					45			
Lys	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys	Gln	Gln	Asn	Glu	Asp	Leu	Arg	Arg	Met	Ala
	50					55					60				
Glu	Ser	Leu	Arg	Ile	Pro	Glu	Gly	Pro	Ile	Asp	Gln	Gly	Thr	Ala	Thr
	65				70				75					80	
Gly	Arg	Val	Arg	Val	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Val	Lys	Ala	Lys	Glu	Gln
			85					90					95		
Ile	Glu	Asn	Tyr	Lys	Lys	Gln	Ala	Arg	Asn	Asp	Leu	Gly	Lys	Asp	His
		100					105					110			
Glu	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Asn	Gly	Ala	Lys	Glu	Leu	Trp	Phe
		115				120						125			
Phe	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Lys	Lys	Leu	Glu	Gly	Asn	Glu
	130					135					140				
Leu	Gln	Arg	His	Ala	Asp	Glu	Ile	Leu	Leu	Asp	Leu	Gly	His	His	Glu
	145				150				155					160	
Arg	Ser	Ile	Met	Thr	Asp	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	Gln	Thr	Asp	Gly	Ala
			165				170					175			
Gly	Glu	Trp	Arg	Glu	Lys	Glu	Ala	Lys	Asp	Leu	Thr	Glu	Leu	Val	Gln

180	185	190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg		
195	200	205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu		
210	215	220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr		
225	230	235
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu		
245	250	255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu		
260	265	270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val		
275	280	285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu		
290	295	300
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His		
305	310	315
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile		
325	330	335
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Arg Glu Ile Glu Glu Thr Thr Lys Lys		
340	345	350
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp		
355	360	365
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val		
370	375	380
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Glu Arg Arg Met Lys Val Asp		
385	390	395
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu		
405	410	415
Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile		
420	425	430
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg		
435	440	445
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val		
450	455	460
Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln		
465	470	475
Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile		

485 490 495  
 Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro  
 500 505 510  
 His Gln Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile  
 515 520 525  
 Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn  
 530 535 540  
 Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu  
 545 550 555 560  
 Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys  
 565 570 575

<210> 24

<211> 575

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Met Arg Ala Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe  
 1 5 10 15  
 Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp  
 20 25 30  
 Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala  
 35 40 45  
 Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala  
 50 55 60  
 Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Thr Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln  
 85 90 95  
 Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Ala Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His  
 100 105 110  
 Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe  
 115 120 125  
 Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys His Leu Glu Gly Asn Glu  
 130 135 140  
 Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Ile Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu

145	150	155	160
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala			
	165	170	175
Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln			
	180	185	190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Arg			
	195	200	205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu			
	210	215	220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr			
225	230	235	240
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu			
	245	250	255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Leu			
	260	265	270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Asn Asp Lys Asn Ile Gln Val			
	275	280	285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu			
	290	295	300
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Leu Arg Val His			
305	310	315	320
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile			
	325	330	335
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys			
	340	345	350
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp			
	355	360	365
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val			
	370	375	380
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp			
385	390	395	400
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Thr Leu Leu Lys Glu			
	405	410	415
Ala Lys Thr Lys Tyr Ser Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile			
	420	425	430
Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg			
	435	440	445
Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val			

450                      455                      460  
 Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln  
 465                      470                      475                      480  
 Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile  
                     485                      490                      495  
 Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Val Tyr Pro  
                     500                      505                      510  
 His Lys Pro Arg Thr Glu Glu Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile  
                     515                      520                      525  
 Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Ile Asn  
                     530                      535                      540  
 Arg Lys Leu Gly Lys Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu  
 545                      550                      555                      560  
 Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys  
                     565                      570                      575

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 25

Asp Glu Ser Ile Tyr Ser Asn Tyr Tyr Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Lys  
     1                      5                      10                      15  
 Pro Cys

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 26

aataaaggat cctgggggtca tttgtcttga ggggt

34

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 788

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (13).. (774)

&lt;400&gt; 27

gaa ttc ggc atc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt 48

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu

1

5

10

cta gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg 96

Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val

15

20

25

ttc ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act 144

Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr

30

35

40

ctg aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg 192

Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp

45

50

55

60

ttt cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att 240

Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile

65

70

75

gac gct gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac 288

Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn

80

85

90

ctc tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg 336

Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp

95

100

105

ctg ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att 384

Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile

110

115

120

cac ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca 432

His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr

125                      130                      135                      140  
 tat tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac 480  
 Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp  
                     145                      150                      155  
 ttc tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc 528  
 Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys  
                     160                      165                      170  
 agg ggg ctt ttt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc 576  
 Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile  
                     175                      180                      185  
 acc atc act caa ggt ttg gca gtg tca acc atc tca tca ttc ttt cca 624  
 Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro  
                     190                      195                      200  
 cct ggg tac caa gtc tct ttc tgc ttg gtg atg gta ctc ctt ttt gca 672  
 Pro Gly Tyr Gln Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala  
 205                      210                      215                      220  
 gtg gac aca gga cta tat ttc tct gtg aag aca aac att cga agc tca 720  
 Val Asp Thr Gly Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser  
                     225                      230                      235  
 aca aga gac tgg aag gac cat aaa ttt aaa tgg aga aag gac cct caa 768  
 Thr Arg Asp Trp Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln  
                     240                      245                      250  
 gac aaa tga ccc cag gat cc 788  
 Asp Lys

<210> 28

<211> 254

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala  
     1                      5                      10                      15  
 Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro  
                     20                      25                      30  
 Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln  
                     35                      40                      45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu  
 50 55 60  
 Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu  
 85 90 95  
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln  
 100 105 110  
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys  
 115 120 125  
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn  
 130 135 140  
 Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro  
 145 150 155 160  
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe  
 165 170 175  
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln  
 180 185 190  
 Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln  
 195 200 205  
 Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly  
 210 215 220  
 Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp  
 225 230 235 240  
 Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys  
 245 250

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 51

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 29

tgttggatcc tgtcaatgat gatgatgatg atgaccttga gtgatggtga t

51



&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 620

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (13).. (609)

&lt;400&gt; 30

gaa ttc ggc atc atg tgg cag ctg ctc ctc cca act gct ctg cta ctt 48

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu

1

5

10

cta gtt tca gct ggc atg cgg act gaa gat ctc cca aag gct gtg gtg 96

Leu Val Ser Ala Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val

15

20

25

ttc ctg gag cct caa tgg tac agg gtg ctc gag aag gac agt gtg act 144

Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr

30

35

40

ctg aag tgc cag gga gcc tac tcc cct gag gac aat tcc aca cag tgg 192

Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp

45

50

55

60

ttt cac aat gag agc ctc atc tca agc cag gcc tcg agc tac ttc att 240

Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile

65

70

75

gac gct gcc aca gtc gac gac agt gga gag tac agg tgc cag aca aac 288

Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn

80

85

90

etc tcc acc ctc agt gac ccg gtg cag cta gaa gtc cat atc ggc tgg 336

Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp

95

100

105

ctg ttg ctc cag gcc cct cgg tgg gtg ttc aag gag gaa gac cct att 384

Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile

110

115

120

cac ctg agg tgt cac agc tgg aag aac act gct ctg cat aag gtc aca 432

His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr

125                      130                      135                      140  
 tat tta cag aat ggc aaa ggc agg aag tat ttt cat cat aat tct gac 480  
 Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp  
                     145                      150                      155  
 ttc tac att cca aaa gcc aca ctc aaa gac agc ggc tcc tac ttc tgc 528  
 Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys  
                     160                      165                      170  
 agg ggg ctt ttt ggg agt aaa aat gtg tct tca gag act gtg aac atc 576  
 Arg Gly Leu Phe Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile  
                     175                      180                      185  
 acc atc act caa ggt cat cat cat cat cat cat tga cag gat cc        620  
 Thr Ile Thr Gln Gly His His His His His His  
                     190                      195

<210> 31

<211> 199

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala  
   1                      5                      10                      15  
 Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro  
                     20                      25                      30  
 Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln  
                     35                      40                      45  
 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu  
                     50                      55                      60  
 Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr  
   65                      70                      75                      80  
 Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu  
                     85                      90                      95  
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln  
                     100                      105                      110  
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys  
                     115                      120                      125  
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn

130                      135                      140  
 Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro  
 145                      150                      155                      160  
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe  
                     165                      170                      175  
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln  
                     180                      185                      190  
 Gly His His His His His His  
                     195

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 32

aggaaggtgg cgctcatcac gggc

24

<210> 33

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 33

taaggccaca agtcttaatt gcatcc

26

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 34

caggggtgtt cccttgagga ggtggaa

27

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 35

cccctcacgc atgaagcctg gag

23

<210> 36

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 36

ggcaggagac caccttgcca gtgcccac

28

<210> 37

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 37

ggcgctggct tacccggaga ggaatggg

28

<210> 38

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 38

aaaaggcctc agttagtgaa ctgtatgg

28

<210> 39

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 39

cgcggatcct caagcgttgg ggttggtcc

29

<210> 40

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 40

cccaagcttg ccaccatggc tcacgtccc gctagctgcc cgagc 45

<210> 41

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 41

ccggaattct gccaaagtatg agccatcctg g 31

<210> 42

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 42

gccatccaga aggtggt 17

<210> 43

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 43

gtcttgtcag ggaagat

17

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 44

ggcaggagac caccttgcca gtgcccac

28

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 45

gggtgggctg taccttctgg aacagggc

28

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 46

ggcgctggct taccggaga ggaatggg

28

<210> 47

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 47

ggaatgggtg tttgtctctc caaagatgc

28

<210> 48

<211> 1316

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 48

gccccgcccc ctccacctgg accgagagta gctggagaat tgtgcaccgg aagtagctct 60  
 tggactggtg gaaccttgcg caggtgcagc aacaatgggt gagccccagg gatccaggag 120  
 gatactagtg acagggggct ctggactggt gggcagagct atccagaagg tggtcgcaga 180  
 tggcgctggc ttaccgggag aggaatgggt gtttgtctcc tccaaagatg cagatctgac 240  
 ggatgcagca caaacccaag ccctgttcca gaaggtacag cccacccatg tcatccatct 300  
 tgctgcaatg gtaggaggcc ttttccgaa tatcaaatac aacttggatt tctggaggaa 360  
 gaatgtgcac atcaatgaca acgtcctgca ctacagcttcc gaggtgggca ctgcgaaggt 420  
 ggtctcctgc ctgtccacct gtatcttccc tgacaagacc acctatccta ttgatgaaac 480  
 aatgatccac aatggtccac cccacagcag caattttggg tactcgtatg ccaagaggat 540  
 gattgacgtg cagaacaggg cctacttcca gcagcatggc tgcaccttca ctgctgtcat 600  
 ccctaccaat gtctttggac ctcatgacaa cttcaacatt gaagatggcc atgtgctgcc 660  
 tggcctcatc cataaggtgc atctggccaa gagtaatggt tcagccttga ctgtttgggg 720  
 tacagggaaa ccacggaggc agttcatcta ctactggac ctagcccggc tcttcatctg 780  
 ggtcctgctg gagtacaatg aagttgagcc catcatcctc tcagtgggcg aggaagatga 840  
 agtctccatt aaggaggcag ctgaggctgt agtggaggcc atggacttct gtggggaagt 900  
 cacttttgat tcaacaaagt cagatgggca gtataagaag acagccagca atggcaagct 960  
 tcgggcctac ttgcctgatt tccgtttcac acccttcaag caggctgtga aggagacctg 1020  
 tgcctggttc accgacaact atgagcaggc ccggaagtga agcatgggac aagcgggtgc 1080



tcagctggca atgcccagtc agtaggctgc agtctcatca ttgcttgtc aagaactgag 1140  
gacagtatcc agcaacctga gccacatgct ggtctctctg ccagggggct tcatgcagcc 1200  
atccagtagg gcccatgttt gtccatcctc gggggaaggc cagaccaaca cctgtttgt 1260  
ctgcttctgc cccaacctca gtgcatccat gctggtcctg ctgtcccttg tctaga 1316

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 49

gacctgctg ggaccaaaat tgg 23

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 50

cttaacatcc caagggatgc tg 22

<210> 51

<211> 1965

<212> DNA

<213> *Cricetulus griseus*

<400> 51

acggggggct cccggaagcg gggaccatgg cgtctctgcg cgaagcgagc ctgcggaagc 60  
tgcggcgctt ttccgagatg agaggcaaac ctgtggcaac tgggaaattc tgggatgtag 120

```

ttgtaataac agcagctgac gaaaagcagg agcttgctta caagcaacag ttgtcggaga 180
agctgaagag aaaggaattg ccccttgagg ttaactacca tgttttcact gatcctcctg 240
gaacaaaaat tggaaatgga ggatcaacac tttgttctct tcagtgcctg gaaagcctct 300
atggagacaa gtggaattcc ttcacagtcc tgttaattca ctctgggtggc tacagtcaac 360
gacttcccaa tgcaagcgct ttaggaaaaa tcttcacggc tttaccactt ggtgagccca 420
tttatcagat gttggactta aaactagcca tgtacatgga tttccctca cgcatagaagc 480
ctggagtttt ggtcacctgt gcagatgata ttgaactata cagcattggg gactctgagt 540
ccattgcatt tgagcagcct ggctttactg ccctagccca tccatctagt ctggctgtag 600
gcaccacaca tggagtatth gtattggact ctgccggttc tttgcaacat ggtgacctag 660
agtacaggca atgccaccgt ttcctccata agcccagcat tgaaaacatg caccacttta 720
atgccgtgca tagactagga agctttggtc aacaggactt gagtgggggt gacaccacct 780
gtcatccatt gcactctgag tatgtctaca cagatagcct attttacatg gatcataaat 840
cagccaaaaa gctacttgat ttctatgaaa gtgtaggccc actgaactgt gaaatagatg 900
cctatggtga ctttctgcag gcactgggac ctggagcaac tgcagagtac accaagaaca 960
cctcacacgt cactaaagag gaatcacact tgttggacat gaggcagaaa atattccacc 1020
tcctcaaggg aacacccctg aatgttgttg tccttaataa ctccaggttt tatcacattg 1080
gaacaacgga ggagtatctg ctacatttca cttccaatgg ttcgttacag gcagagctgg 1140
gcttgcaatc catagctttc agtgtctttc caaatgtgcc tgaagactcc catgagaaac 1200
cctgtgtcat tcacagcatc ctgaattcag gatgctgtgt ggcccctggc tcagtggtag 1260
aatattccag attaggacct gaggtgtcca tctcgaaaaa ctgcattatc agcggttctg 1320
tcatagaaaa agctgttctg ccccatgtt ctttctgttg ctctttaagt gtggagataa 1380
atggacactt agaatatcca actatggtgt ttggcatgga agacaacttg aagaacagtg 1440
ttaaaacat atcagatata aagatgcttc agttctttgg agtctgtttc ctgacttgtt 1500
tagatatttg gaaccttaaa gctatggaag aactattttc aggaagtaag acgcagctga 1560
gcctgtggac tgctcgaatt ttccctgtct gttcttctct gagtgagtcg gttgcagcat 1620
cccttgggat gttaaatgcc attcgaaacc attcgccatt cagcctgagc aacttcaagc 1680
tgctgtccat ccaggaaatg cttctctgca aagatgtagg agacatgctt gcttacaggg 1740
agcaactctt tctagaaatc agttcaaaga gaaaacagtc tgattcggag aaatcttaaa 1800
tacaatgat tttgcctgga aacaggattg caaatgcagg catattctat agatctcttg 1860
gttcttcttt ctttctcccc tctctctttt ctttccctt tgatgtaatg acaaaggtaa 1920
aaatggccac ttctgatgga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1965

```

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 52

caggggtgtt cccttgagga ggtggaa

27

<210> 53

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 53

cactgagcca ggggccacac agcatcc

27

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 54

cccctcacgc atgaagcctg gag

23

<210> 55

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 55

tgccaccgtt tcctccataa gccccagc

27

<210> 56

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 56

atggctcaag ctcccgctaa gtgcccga

28

<210> 57

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 57

tcaagcgttt gggttggtcc tcatgag

27

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 58

tccggggatg gcgagatggg caagc

25

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 59

cttgacatgg ctctgggctc caag

24

<210> 60

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 60

ccacttcagt cggtcggtag tatatt

25

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 61

cgctcaccgc cctgaggcga catg

24

<210> 62

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 62

ggcaggtgct gtcggtgagg tcaccatagt gc

32

<210> 63

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 63

ggggccatgc caaggactat gtcg

24

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 64

atgtggctga tgttacaaaa tgatg

25

<210> 65

&lt;211&gt; 1504

&lt;212&gt; DNA

<213> *Cricetulus griseus*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1119)

&lt;400&gt; 65

```

atg gct cac gct ccc gct agc tgc ccg agc tcc agg aac tct ggg gac 48
Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp
  1           5           10          15
ggc gat aag ggc aag ccc agg aag gtg gcg ctc atc acg ggc atc acc 96
Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr
          20          25          30
ggc cag gat ggc tca tac ttg gca gaa ttc ctg ctg gag aaa gga tac 144
Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr
          35          40          45
gag gtt cat gga att gta cgg cga tcc agt tca ttt aat aca ggt cga 192
Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg
          50          55          60
att gaa cat tta tat aag aat cca cag gct cat att gaa gga aac atg 240
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met
          65          70          75          80
aag ttg cac tat ggt gac ctc acc gac agc acc tgc cta gta aaa atc 288
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile
          85          90          95          100
atc aat gaa gtc aaa cct aca gag atc tac aat ctt ggt gcc cag agc 336
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser
          105          110          115
cat gtc aag att tcc ttt gac tta gca gag tac act gca gat gtt gat 384
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp
          120          125          130
gga gtt ggc acc ttg cgg ctt ctg gat gca att aag act tgt ggc ctt 432
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu
          135          140          145
ata aat tct gtg aag ttc tac cag gcc tca act agt gaa ctg tat gga 480
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly

```

150	155	160	
aaa gtg caa gaa ata ccc cag aaa gag acc acc cct ttc tat cca agg	528		
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg			
165	170	175	180
tcg ccc tat gga gca gcc aaa ctt tat gcc tat tgg att gta gtg aac	576		
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn			
185	190	195	
ttt cga gag gct tat aat ctc ttt gcg gtg aac ggc att ctc ttc aat	624		
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn			
200	205	210	
cat gag agt cct aga aga gga gct aat ttt gtt act cga aaa att agc	672		
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser			
215	220	225	
cgg tca gta gct aag att tac ctt gga caa ctg gaa tgt ttc agt ttg	720		
Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu			
230	235	240	
gga aat ctg gac gcc aaa cga gac tgg ggc cat gcc aag gac tat gtc	768		
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val			
245	250	255	260
gag gct atg tgg ctg atg tta caa aat gat gaa cca gag gac ttt gtc	816		
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val			
265	270	275	
ata gct act ggg gaa gtt cat agt gtc cgt gaa ttt gtt gag aaa tca	864		
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser			
280	285	290	
ttc atg cac att gga aag acc att gtg tgg gaa gga aag aat gaa aat	912		
Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn			
295	300	305	
gaa gtg ggc aga tgt aaa gag acc ggc aaa att cat gtg act gtg gat	960		
Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp			
310	315	320	
ctg aaa tac tac cga cca act gaa gtg gac ttc ctg cag gga gac tgc	1008		
Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys			
325	330	335	340
tcc aag gcg cag cag aaa ctg aac tgg aag ccc cgc gtt gcc ttt gac	1056		
Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp			
345	350	355	
gag ctg gtg agg gag atg gtg caa gcc gat gtg gag ctc atg aga acc	1104		



Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr

360

365

370

aac ccc aac gcc tga gcacctctac aaaaaaattc gcgagacatg gactatgggtg 1159

Asn Pro Asn Ala

375

cagagccagc caaccagagt ccagccactc ctgagaccat cgaccataaa cctcgcactg 1219

cctgtgtcgt cccacagct aagagctggg ccacaggttt gtgggcacca ggacggggac 1279

actccagagc taaggccact tcgcttttgt caaaggctcc tctcaatgat ttgaggaaat 1339

caagaagttt aaaatcacat actcatttta cttgaaatta tgcactaga caacttaaat 1399

ttttgagtct tgagattggt tttctctttt cttattaaat gatctttcta tgaccagca 1459

aaaaaaaaa aaaaaaggga tataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1504

<210> 66

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 66

atgaagttgc actatgggtga cctca 25

<210> 67

<211> 59

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 67

ccgacagcac ctgcctagta aaaatcatca atgaagtcaa acctacagag atctacaat 59

<210> 68

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 68

gacttagcag agtacactgc agatg

25

<210> 69

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 69

accttggata gaaaggggtg gtctc

25

<210> 70

<211> 125

<212> DNA

<213> Cricetulus griseus

<400> 70

ttgatggagt tggcaccttg cggcttctgg atgcaattaa gacttgtggc cttataaatt 60

ctgtgaagtt ctaccaggcc tcaactagtg aactgtatgg aaaagtgcaa gaaataccccc 120

agaaa 125

<210> 71

<211> 376

<212> PRT

<213> Cricetulus griseus

<400> 71

Met Ala His Ala Pro Ala Ser Cys Pro Ser Ser Arg Asn Ser Gly Asp

1	5	10	15
Gly Asp Lys Gly Lys Pro Arg Lys Val Ala Leu Ile Thr Gly Ile Thr			
20	25	30	
Gly Gln Asp Gly Ser Tyr Leu Ala Glu Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr			
35	40	45	
Glu Val His Gly Ile Val Arg Arg Ser Ser Ser Phe Asn Thr Gly Arg			
50	55	60	
Ile Glu His Leu Tyr Lys Asn Pro Gln Ala His Ile Glu Gly Asn Met			
65	70	75	80
Lys Leu His Tyr Gly Asp Leu Thr Asp Ser Thr Cys Leu Val Lys Ile			
85	90	95	100
Ile Asn Glu Val Lys Pro Thr Glu Ile Tyr Asn Leu Gly Ala Gln Ser			
105	110	115	
His Val Lys Ile Ser Phe Asp Leu Ala Glu Tyr Thr Ala Asp Val Asp			
120	125	130	
Gly Val Gly Thr Leu Arg Leu Leu Asp Ala Ile Lys Thr Cys Gly Leu			
135	140	145	
Ile Asn Ser Val Lys Phe Tyr Gln Ala Ser Thr Ser Glu Leu Tyr Gly			
150	155	160	
Lys Val Gln Glu Ile Pro Gln Lys Glu Thr Thr Pro Phe Tyr Pro Arg			
165	170	175	180
Ser Pro Tyr Gly Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Trp Ile Val Val Asn			
185	190	195	
Phe Arg Glu Ala Tyr Asn Leu Phe Ala Val Asn Gly Ile Leu Phe Asn			
200	205	210	
His Glu Ser Pro Arg Arg Gly Ala Asn Phe Val Thr Arg Lys Ile Ser			
215	220	225	
Arg Ser Val Ala Lys Ile Tyr Leu Gly Gln Leu Glu Cys Phe Ser Leu			
230	235	240	
Gly Asn Leu Asp Ala Lys Arg Asp Trp Gly His Ala Lys Asp Tyr Val			
245	250	255	260
Glu Ala Met Trp Leu Met Leu Gln Asn Asp Glu Pro Glu Asp Phe Val			
265	270	275	
Ile Ala Thr Gly Glu Val His Ser Val Arg Glu Phe Val Glu Lys Ser			
280	285	290	
Phe Met His Ile Gly Lys Thr Ile Val Trp Glu Gly Lys Asn Glu Asn			
295	300	305	
Glu Val Gly Arg Cys Lys Glu Thr Gly Lys Ile His Val Thr Val Asp			

310                      315                      320  
 Leu Lys Tyr Tyr Arg Pro Thr Glu Val Asp Phe Leu Gln Gly Asp Cys  
 325                      330                      335                      340  
 Ser Lys Ala Gln Gln Lys Leu Asn Trp Lys Pro Arg Val Ala Phe Asp  
                     345                      350                      355  
 Glu Leu Val Arg Glu Met Val Gln Ala Asp Val Glu Leu Met Arg Thr  
                     360                      365                      370  
 Asn Pro Asn Ala  
                     375

<210> 72

<211> 420

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(420)

<400> 72

atg gaa tgg atc tgg atc ttt ctc ttc ttc ctc tca gga act aca ggt 48  
 Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly  
   1                      5                      10                      15  
 gtc tac tcc cag gtt cag ctg cag cag tct gga gct gag gtg gcg agg 96  
 Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg  
                     20                      25                      30  
 ccc ggg gct tca gtg aaa ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
                     35                      40                      45  
 act gac tac tat cta aac tgg gtg aag cag agg tct gga cag ggc ctt 192  
 Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu  
                     50                      55                      60  
 gag tgg att gga gag att gat cct gga agt gat agt ata tat tat aat 240  
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn  
                     65                      70                      75                      80  
 gaa aac ttg gag ggc agg gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288  
 Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser

```

      85              90              95
aca gcc tac atg cag ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
      100              105              110
tat ttc tgt gca aga tat ggg tat tct aga tac gac gta agg ttt gtc 384
Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val
      115              120              125
tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct aca 420
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr
      130              135              140

```

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 140

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 73

```

Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly
  1              5              10              15
Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg
      20              25              30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
      35              40              45
Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
      50              55              60
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn
      65              70              75              80
Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
      85              90              95
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
      100              105              110
Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val
      115              120              125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr
      130              135              140

```

&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(393)

&lt;400&gt; 74

```

atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
      1              5              10              15
tcc agg agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
              20              25              30
agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agt ctt 144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
              35              40              45
gta cat agt aat gga aga acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cct 192
Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
              50              55              60
ggc cag tca cca aag gtc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga att tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser
              65              70              75              80
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
              85              90              95
ctc aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc 336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
              100              105              110
ttt cag ggt tca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg 384
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
              115              120              125
gaa ata aaa 393
Glu Ile Lys
      130

```

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 131

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 75

```

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
  1             5             10             15
Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
          20             25             30
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
          35             40             45
Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
          50             55             60
Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser
          65             70             75             80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
          85             90             95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
          100            105            110
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
          115            120            125
Glu Ile Lys
          130

```

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 76

```

Asp Tyr Tyr Leu Asn
  1             5

```

&lt;210&gt; 77

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 77

Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu Glu

1

5

10

15

Gly

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 78

Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr

1

5

10

<210> 79

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 79

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu

1

5

10

15

<210> 80

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 80

Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser

1

5



<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 81

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr

1

5

<210> 82

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 82

ctgaattcgc ggccgctagt cc

22

<210> 83

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 83

atgggccctt ggtggaggct gtagagacag tgaccagag

39

<210> 84

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 84

ctgaattcgc ggccgctgct gt

22

<210> 85

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 85

atcgtagctt ttatttccag cttggtcc

28

<210> 86

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 86

ttgttggtac cgaattcttt cagggcccg gagcccgag agcccaaatac ttgtgac

57

<210> 87

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 87

gcgaattcca ccatgggcag cccccgctcc g

31

<210> 88

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 88

cgggatccct atcggggctc cggggcccaa gt

32

<210> 89

<211> 1341

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 89

atg ggc agc ccc cgc tcc gcg ctg agc tgc ctg ctg ttg cac ttg ctg 48

Met Gly Ser Pro Arg Ser Ala Leu Ser Cys Leu Leu Leu His Leu Leu

1 5 10 15

gtt ctc tgc ctc caa gcc cag gta act gtt cag tcc tca cct aat ttt 96

Val Leu Cys Leu Gln Ala Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe

20 25 30

aca cag cat gtg agg gag cag agc ctg gtg acg gat cag ctc agc cgc 144

Thr Gln His Val Arg Glu Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Ser Arg

35 40 45

cgc ctc atc cgg acc tac cag ctc tac agc cgc acc agc ggg aag cac 192

Arg Leu Ile Arg Thr Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His

50	55	60	
gtg cag gtc ctg gcc aac aag cgc atc aac gcc atg gca gaa gac gga	240		
Val Gln Val Leu Ala Asn Lys Arg Ile Asn Ala Met Ala Glu Asp Gly			
65	70	75	80
gac ccc ttc gcg aag ctc att gtg gag acc gat act ttt gga agc aga	288		
Asp Pro Phe Ala Lys Leu Ile Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Arg			
85	90	95	
gtc cga gtt cgc ggc gca gag aca ggt ctc tac atc tgc atg aac aag	336		
Val Arg Val Arg Gly Ala Glu Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Met Asn Lys			
100	105	110	
aag ggg aag cta att gcc aag agc aac ggc aaa ggc aag gac tgc gta	384		
Lys Gly Lys Leu Ile Ala Lys Ser Asn Gly Lys Gly Lys Asp Cys Val			
115	120	125	
ttc aca gag atc gtg ctg gag aac aac tac acg gcg ctg cag aac gcc	432		
Phe Thr Glu Ile Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Gln Asn Ala			
130	135	140	
aag tac gag ggc tgg tac atg gcc ttt acc cgc aag ggc cgg ccc cgc	480		
Lys Tyr Glu Gly Trp Tyr Met Ala Phe Thr Arg Lys Gly Arg Pro Arg			
145	150	155	160
aag ggc tcc aag acg cgc cag cat cag cgc gag gtg cac ttc atg aag	528		
Lys Gly Ser Lys Thr Arg Gln His Gln Arg Glu Val His Phe Met Lys			
165	170	175	
cgc ctg ccg cgg ggc cac cac acc acc gag cag agc ctg cgc ttc gag	576		
Arg Leu Pro Arg Gly His His Thr Thr Glu Gln Ser Leu Arg Phe Glu			
180	185	190	
ttc ctc aac tac ccg ccc ttc acg cgc agc ctg cgc ggc agc cag agg	624		
Phe Leu Asn Tyr Pro Pro Phe Thr Arg Ser Leu Arg Gly Ser Gln Arg			
195	200	205	
act tgg gcc ccg gag ccc cga gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac	672		
Thr Trp Ala Pro Glu Pro Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His			
210	215	220	
aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc	720		
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			
225	230	235	240
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc	768		
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr			
245	250	255	
cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag	816		

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 260 265 270  
 gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag 864  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 275 280 285  
 aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc 912  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 290 295 300  
 gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag 960  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 1008  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 325 330 335  
 tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 1056  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 340 345 350  
 cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 1104  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 355 360 365  
 gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 1152  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 370 375 380  
 ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1200  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 385 390 395 400  
 gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1248  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 410 415  
 tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1296  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 420 425 430  
 cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa 1341  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 447

&lt;212&gt; protein

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt;90

```

Met Gly Ser Pro Arg Ser Ala Leu Ser Cys Leu Leu Leu His Leu Leu
  1             5             10             15
Val Leu Cys Leu Gln Ala Gln Val Thr Val Gln Ser Ser Pro Asn Phe
      20             25             30
Thr Gln His Val Arg Glu Gln Ser Leu Val Thr Asp Gln Leu Ser Arg
      35             40             45
Arg Leu Ile Arg Thr Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys His
      50             55             60
Val Gln Val Leu Ala Asn Lys Arg Ile Asn Ala Met Ala Glu Asp Gly
      65             70             75             80
Asp Pro Phe Ala Lys Leu Ile Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Arg
      85             90             95
Val Arg Val Arg Gly Ala Glu Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Met Asn Lys
      100            105            110
Lys Gly Lys Leu Ile Ala Lys Ser Asn Gly Lys Gly Lys Asp Cys Val
      115            120            125
Phe Thr Glu Ile Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Gln Asn Ala
      130            135            140
Lys Tyr Glu Gly Trp Tyr Met Ala Phe Thr Arg Lys Gly Arg Pro Arg
      145            150            155            160
Lys Gly Ser Lys Thr Arg Gln His Gln Arg Glu Val His Phe Met Lys
      165            170            175
Arg Leu Pro Arg Gly His His Thr Thr Glu Gln Ser Leu Arg Phe Glu
      180            185            190
Phe Leu Asn Tyr Pro Pro Phe Thr Arg Ser Leu Arg Gly Ser Gln Arg
      195            200            205
Thr Trp Ala Pro Glu Pro Arg Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
      210            215            220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
      225            230            235            240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
      245            250            255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

```

260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445

&lt;210&gt; 91

&lt;211&gt; 1245

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Cricetulus griseus

&lt;400&gt; 91

gaacttcacc caagccatgt gacaattgaa ggctgtaccc ccagacccta acatcttgga	60
gccctgtaga ccaggagtg cttctggcgc tggggtgacc tagctcttct accaccatga	120
acagggccccc tctgaagcgg tccaggatcc tgcgcatggc gctgactgga ggctccactg	180
cctctgagga ggcagatgaa gacagcagga acaagccgtt tctgctgcgg gcgctgcaga	240
tcgcgctggt cgtctctctc tactgggtca cctccatctc catgggtattc ctcaacaagt	300
acctgctgga cagccctcc ctgcagctgg ataccctat ctctgctact ttctaccaat	360
gcctggtgac ctctctgctg tgcaagggcc tcagcactct ggccacctgc tgccctggca	420

```

ccgttgactt cccaccctg aacctggacc ttaaggtggc ccgcagcgtg ctgccactgt 480
cggtagtctt cattggcatg ataagtttca ataacctctg cctcaagtac gtaggggtgg 540
ccttctacaa cgtgggggcgc tcgtcacca ccgtgttcaa tgtgttctg tcctacctgc 600
tgctcaaaca gaccattcc ttctatgcc tgctcacatg tggcatcatc attggtggtt 660
tctggctggg tatagaccaa gagggagctg agggcaccct gtccctcata ggcaccatct 720
tcgggggtgct ggccagcctc tgcgtctccc tcaatgcat ctataccaag aaggtgctcc 780
cagcagtggg caacagcatc tggcgcctaa ctttctataa caatgtcaat gcctgtgtgc 840
tcttcttgcc cctgatggtt ctgctgggtg agctccgtgc cctccttgac tttgctcatc 900
tgtacagtgc ccacttctgg ctcatgatga cgctgggtgg cctcttcggc tttgccattg 960
gctatgtgac aggactgcag atcaaattca ccagtccct gaccacaaat gtatcaggca 1020
cagccaaggc ctgtgcgcag acagtgtgg ccgtgctcta ctatgaagag actaagagct 1080
tcctgtggtg gacaagcaac ctgatggtg tgggtggctc ctacagctat acctgggtca 1140
ggggctggga gatgcagaag acccaagagg accccagctc caaagagggt gagaagagt 1200
ctattggggt gtgagcttct tcagggacct gggactgaac ccaag 1245

```

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 365

&lt;212&gt; PRT

<213> *Cricetulus griseus*

&lt;400&gt; 92

```

Met Asn Arg Ala Pro Leu Lys Arg Ser Arg Ile Leu Arg Met Ala Leu
  1             5             10             15
Thr Gly Gly Ser Thr Ala Ser Glu Glu Ala Asp Glu Asp Ser Arg Asn
      20             25             30
Lys Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser Leu
      35             40             45
Tyr Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu Leu
      50             55             60
Asp Ser Pro Ser Leu Gln Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe Tyr
      65             70             75             80
Gln Cys Leu Val Thr Ser Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser Thr Leu Ala
      85             90             95
Thr Cys Cys Pro Gly Thr Val Asp Phe Pro Thr Leu Asn Leu Asp Leu
      100            105            110
Lys Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe Ile Gly Met
      115            120            125

```



Ile Ser Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val Ala Phe Tyr  
 130 135 140  
 Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser Tyr  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys Gly  
 165 170 175  
 Ile Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu Gly Ala Glu  
 180 185 190  
 Gly Thr Leu Ser Leu Ile Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu Ala Ser Leu  
 195 200 205  
 Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu Pro Ala Val  
 210 215 220  
 Asp Asn Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala Cys  
 225 230 235 240  
 Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Val Leu Leu Gly Glu Leu Arg Ala Leu  
 245 250 255  
 Leu Asp Phe Ala His Leu Tyr Ser Ala His Phe Trp Leu Met Met Thr  
 260 265 270  
 Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu Gln  
 275 280 285  
 Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala Lys  
 290 295 300  
 Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Thr Lys  
 305 310 315 320  
 Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Ser Ser  
 325 330 335  
 Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr Gln Glu Asp  
 340 345 350  
 Pro Ser Ser Lys Glu Gly Glu Lys Ser Ala Ile Gly Val  
 355 360 365

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 1095

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 93

```

atgaataggg cccctctgaa gcggtccagg atcctgcaca tggcgtgac cggggcctca    60
gacccctctg cagaggcaga ggccaacggg gagaagccct ttctgctgcg ggcatctgag    120
atcgcgctgg tggctctccct ctactgggtc acctccatct ccatgggtgtt ccttaataag    180
tacctgctgg acagccctc cctgcggctg gacaccccca tcttcgtcac cttctaccag    240
tgcctgggtga ccacgtgct gtgcaaaggc ctcagcgctc tggccgcctg ctgccctggg    300
gccgtggact tccccagctt gcgcctggac ctcagggtgg ccgcgagcgt cctgcccttg    360
tcggtgggtct tcacggcat gatcaccttc aataacctct gcctcaagta cgtcgggtgtg    420
gcctttctaca atgtgggccc ctcactcacc accgtcttca acgtgctgct ctcctacctg    480
ctgctcaagc agaccacctc cttctatgcc ctgctcacct gcggtatcat catcgggggc    540
ttctggccttg gtgtggacca ggagggggca gaaggcacc cgtcgtgggt gggcaccgtc    600
ttcggcgtgc tggctagcct ctgtgtctcg ctcaacgcca tctacaccac gaagggtgctc    660
ccggcggttg acggcagcat ctggcgctg actttctaca acaacgtcaa cgcctgcac    720
ctcttcctgc ccctgctcct gctgctcggg gagcttcagg ccctgcgtga ctttgcccag    780
ctgggcagtg ccacttctg ggggatgatg acgtggggcg gcctgtttgg ctttgccatc    840
ggctacgtga caggactgca gatcaagttc accagtccgc tgaccacaaa tgtgtcgggc    900
acggccaagg cctgtgcca gacagtgtg gccgtgtct actacgagga gaccaagagc    960
ttcctctggt ggacgagcaa catgatggtg ctggcggtt cctccgcta cacctgggtc   1020
aggggctggg agatgaagaa gactccggag gagcccagcc ccaaagacag cgagaagagc   1080
gccatggggg tgtga                                     1095

```

<210> 94

<211> 364

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

```

Met Asn Arg Ala Pro Leu Lys Arg Ser Arg Ile Leu His Met Ala Leu
  1                   5                   10                   15
Thr Gly Ala Ser Asp Pro Ser Ala Glu Ala Glu Ala Asn Gly Glu Lys
      20                   25                   30
Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser Leu Tyr
      35                   40                   45
Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu Leu Asp
      50                   55                   60
Ser Pro Ser Leu Arg Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe Tyr Gln
      65                   70                   75                   80
Cys Leu Val Thr Thr Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser Ala Leu Ala Ala

```

	85		90		95
Cys Cys Pro Gly Ala Val Asp Phe Pro Ser Leu Arg Leu Asp Leu Arg					
	100		105		110
Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe Ile Gly Met Ile					
	115		120		125
Thr Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val Ala Phe Tyr Asn					
	130		135		140
Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser Tyr Leu					
145		150		155	160
Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys Gly Ile					
	165		170		175
Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Val Asp Gln Glu Gly Ala Glu Gly					
	180		185		190
Thr Leu Ser Trp Leu Gly Thr Val Phe Gly Val Leu Ala Ser Leu Cys					
	195		200		205
Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Thr Lys Val Leu Pro Ala Val Asp					
	210		215		220
Gly Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala Cys Ile					
225		230		235	240
Leu Phe Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Glu Leu Gln Ala Leu Arg					
	245		250		255
Asp Phe Ala Gln Leu Gly Ser Ala His Phe Trp Gly Met Met Thr Leu					
	260		265		270
Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu Gln Ile					
	275		280		285
Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala Lys Ala					
	290		295		300
Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Thr Lys Ser					
305		310		315	320
Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Met Met Val Leu Gly Gly Ser Ser Ala					
	325		330		335
Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Lys Lys Thr Pro Glu Glu Pro					
	340		345		350
Ser Pro Lys Asp Ser Glu Lys Ser Ala Met Gly Val					
	355		360		364

&lt;210&gt; 95

&lt;211&gt; 2609

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 95

```

gagccgaggg tggtgctgca ggtgcacccg agggcaccgc cgagggtgag caccaggtcc   60
ctgcatcagc caggacacca gagcccagtc gggtaggacgg acgggcgcct ctgaagcggc   120
ccaggatcct gcgcatggcg ctgactggag tctctgctgt ctccgaggag tcagagagcg   180
ggaacaagcc atttctgctc cgggctctgc agatcgcgct ggtggtctct ctctactggg   240
tcacctccat ttccatggta ttccctcaaca agtacctgct ggacagcccc tccctgcagc   300
tggtataccc catttttgtc accttctacc aatgcctggg gacctactg ctgtgcaagg   360
gcctcagcac tctggccacc tgctgccccg gcatggtaga cttccccacc ctaaacctgg   420
acctcaaggt ggcccgaagt gtgctgccgc tgtcagtggg ctttatcggc atgataacct   480
tcaataacct ctgcctcaag tacgtagggg tgcccttcta caacgtggga cgctcgctca   540
ccaccgtgtt caacgttctt ctctcctacc tgctgctcaa acagaccact tccttctatg   600
ccctgctcac ctgcggcgtc atcattgggtg gtttctggct gggatatagac caagaaggag   660
ctgaggggaac cttgtccctg acgggcacca tcttcggggg gctggccagc ctctgcgtct   720
ccctcaatgc catctatacc aagaagggtgc tcctgcagt agaccacagt atctggcgcc   780
taaccttcta taacaatgtc aatgcctgcg tgctcttctt gcccctgatg atagtgtctg   840
gcgagctccg tgccctcctg gccttctact atctgagcag tgcccacttc tggctcatga   900
tgacgtggg tggcctgttt ggctttgcca tcggctatgt gacaggactg cagatcaaata   960
tcaccagtcc cctgacccat aacgtgtcag gcacggccaa ggccgtgtgca cagacagtgc  1020
tggccgtgct ctactacgaa gagattaaga gcttctgtg gtggacaagc aacctgatgg  1080
tgctgggtgg ctctccgcc tacacctggg tcaggggctg ggagatgcag aagaccagg  1140
aggacccag ctccaaagat ggtgagaaga gtgctatcag ggtgtgagct cttcaggga  1200
gccagggtg agctcgggtg gggcctgccc agcacggaag gcttccata gacccactg  1260
ggtatggccc tgagcaataa tgtttacatc cttctcagaa gaccatctaa gaagagccag  1320
gttctttcct gataatgtca gaaagctgcc aaatctcctg cctgccccat cttctagtct  1380
tgggaaagcc ctaccaggag tggcaccctt cctgcctcct cctggggcct gtctacctcc  1440
atatggtctc tggggttggg gccagctgca ctctttgggc actggactga tgaagtgatg  1500
tcttactttc tacacaaggg agatgggttg tgaccctact atagctagtt gaaggagct  1560
gtgtaacccc acatctcttg ggcctgggc aggtagcata atagctaggt gctattaaca  1620
tcaataacac ttcagactac ctttggaggc agttgggagc tgagccgaga gagagagatg  1680
gccattctgc cctcttctgt gtggatgggt atgacagacc aactgtccat ggggtgactg  1740
acacctccac acttcatatt ttcaacttta gaaaaggggg agccacacgt ttacagatt  1800
aagtggagtg atgaatgcct ctacagcccc taacccact ttccctgcct ggcttctctt  1860
ggcccagaag ggccaccatc ctgttctcca acacctgacc cagctatctg gctatactct  1920
ctttctgtac tcccttcccc ttccccccc cattagcctc ctcccaaca cctccatctt  1980

```

```

caggcaggaa gtgggggtcca ctcagcctct gttcccatct gcttggaccc ctgagcctct 2040
catgaaggta ggcttatgtt ctctgaggct ggggccggag gagcgactg attctcgag 2100
ttatcccatc aggctcctgt cacaaaatag cctaggccgt gtgtctaaga acagtggagg 2160
ttggcttata actgttctgg gggcagcgaa gccacatca aggtactcat agaccagta 2220
tttctgagga aacccctgtc cacatcctca cttggtaaag gcacagataa tctccctcag 2280
gcctcttgta taggagcact agccctggga gggctccgcc ccatgacctg atcaccccaa 2340
agccttcaac agaaggattc caacatgaat ttggggacag aagcactcag accacgatgc 2400
ccagcaccac accctcctat cctcagggtg gctgtcactg tcctagtccc ttctgtttgg 2460
ccttttgtac cctcatttcc ttggcgctcat gtttgatgtc tttgtctctt tcgtgagaag 2520
atggggaaac catgtcagcc tctgcttccg acttcccatg ggttctaata aagttgggtg 2580
ggcctgatgc cctgagttgt atgtgattt 2609

```

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 360

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 96

```

Met Ala Leu Thr Gly Val Ser Ala Val Ser Glu Glu Ser Glu Ser Gly
  1             5             10             15
Asn Lys Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser
      20             25             30
Leu Tyr Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu
      35             40             45
Leu Asp Ser Pro Ser Leu Gln Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe
      50             55             60
Tyr Gln Cys Leu Val Thr Ser Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser Thr Leu
      65             70             75             80
Ala Thr Cys Cys Pro Gly Met Val Asp Phe Pro Thr Leu Asn Leu Asp
      85             90             95
Leu Lys Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe Ile Gly
      100            105            110
Met Ile Thr Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val Pro Phe
      115            120            125
Tyr Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser
      130            135            140
Tyr Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys

```

145	150	155	160
Gly Val Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu Gly Ala			
	165	170	175
Glu Gly Thr Leu Ser Leu Thr Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu Ala Ser			
	180	185	190
Leu Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu Pro Ala			
	195	200	205
Val Asp His Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala			
	210	215	220
Cys Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Ile Val Leu Gly Glu Leu Arg Ala			
	225	230	235
Leu Leu Ala Phe Thr His Leu Ser Ser Ala His Phe Trp Leu Met Met			
	245	250	255
Thr Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu			
	260	265	270
Gln Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala			
	275	280	285
Lys Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Ile			
	290	295	300
Lys Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Ser			
	305	310	315
Ser Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr Gln Glu			
	325	330	335
Asp Pro Ser Ser Lys Asp Gly Glu Lys Ser Ala Ile Arg Val			
	340	345	350

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 1053

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 97

atggcgctga ctggagcctc tgctgtctct gaggaggcag acagcgagaa caagccattt	60
ctgctacggg ctctgcagat cgcgctggtg gtttctctct actgggtcac ctccatctcc	120
atggtattcc tcaacaagta cctgctggac agcccctccc tgcagctgga taccctcatc	180
ttcgtcacct tctaccaatg cctggtgacc tctgtgtgt gcaaggcct cagcactctg	240
gccacctgct gccctggcat ggtagacttc cccaccctaa acctggacct caaggtggcc	300

```

cgaagtgtgc tgccgctgtc cgtgggtcttt atcggcatga taaccttcaa taacctctgc 360
ctcaagtacg tgggggtggc cttctacaac gtgggacgct cgctcactac cgtgttcaat 420
gtgtttctct cctacctgct gcttaaacag accacttcct tttatgccct gctcacctgt 480
gccatcatca ttgggtggtt ctggctggga atagatcaag agggagctga gggcacctg 540
tccctgacgg gcaccatctt cgggggtgctg gccagcctct gtgtctcact caatgccatc 600
tacaccaaga aggtgctccc tgccgtagac cacagtatct ggcgccctaac cttctataac 660
aacgtcaacg cctgtgtgct cttcttgccc ctgatggtag tgctgggcga gctccatgct 720
ctcctggcct tcgctcatct gaacagcgcc cacttctggg tcatgatgac gctgggtgga 780
ctcttcggct ttgccattgg ctatgtgaca ggactgcaga tcaaattcac cagtcccctg 840
accataatg tgtcgggcac agccaaggcc tgtgcacaga cagtgtggc tgtgtcttac 900
tatgaagaga ttaagagctt cctgtggtgg acaagcaact tgatggtgct ggggtggctcc 960
tctgcctaca cctgggtcag gggtggggag atgcagaaga cccaggagga cccagctcc 1020
aaagagggtg agaagagtgc tatcgggggtg tga 1053

```

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 350

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegiacus

&lt;400&gt; 98

```

Met Ala Leu Thr Gly Ala Ser Ala Val Ser Glu Glu Ala Asp Ser Glu
  1             5             10             15
Asn Lys Pro Phe Leu Leu Arg Ala Leu Gln Ile Ala Leu Val Val Ser
      20             25             30
Leu Tyr Trp Val Thr Ser Ile Ser Met Val Phe Leu Asn Lys Tyr Leu
      35             40             45
Leu Asp Ser Pro Ser Leu Gln Leu Asp Thr Pro Ile Phe Val Thr Phe
      50             55             60
Tyr Gln Cys Leu Val Thr Ser Leu Leu Cys Lys Gly Leu Ser Thr Leu
      65             70             75             80
Ala Thr Cys Cys Pro Gly Met Val Asp Phe Pro Thr Leu Asn Leu Asp
      85             90             95
Leu Lys Val Ala Arg Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Val Phe Ile Gly
      100            105            110
Met Ile Thr Phe Asn Asn Leu Cys Leu Lys Tyr Val Gly Val Ala Phe
      115            120            125
Tyr Asn Val Gly Arg Ser Leu Thr Thr Val Phe Asn Val Leu Leu Ser

```

130	135	140	
Tyr Leu Leu Leu Lys Gln Thr Thr Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Cys			
145	150	155	160
Ala Ile Ile Ile Gly Gly Phe Trp Leu Gly Ile Asp Gln Glu Gly Ala			
165	170	175	
Glu Gly Thr Leu Ser Leu Thr Gly Thr Ile Phe Gly Val Leu Ala Ser			
180	185	190	
Leu Cys Val Ser Leu Asn Ala Ile Tyr Thr Lys Lys Val Leu Pro Ala			
195	200	205	
Val Asp His Ser Ile Trp Arg Leu Thr Phe Tyr Asn Asn Val Asn Ala			
210	215	220	
Cys Val Leu Phe Leu Pro Leu Met Val Val Leu Gly Glu Leu His Ala			
225	230	235	240
Leu Leu Ala Phe Ala His Leu Asn Ser Ala His Phe Trp Val Met Met			
245	250	255	
Thr Leu Gly Gly Leu Phe Gly Phe Ala Ile Gly Tyr Val Thr Gly Leu			
260	265	270	
Gln Ile Lys Phe Thr Ser Pro Leu Thr His Asn Val Ser Gly Thr Ala			
275	280	285	
Lys Ala Cys Ala Gln Thr Val Leu Ala Val Leu Tyr Tyr Glu Glu Ile			
290	295	300	
Lys Ser Phe Leu Trp Trp Thr Ser Asn Leu Met Val Leu Gly Gly Ser			
305	310	315	320
Ser Ala Tyr Thr Trp Val Arg Gly Trp Glu Met Gln Lys Thr Gln Glu			
325	330	335	
Asp Pro Ser Ser Lys Glu Gly Glu Lys Ser Ala Ile Gly Val			
340	345	350	

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 7752

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 99

agcgttgcaa gttcagccga ggggtggtgct gcagggtgcac ccgaggggcac cgccgagggt	60
gagcaccagg tccctgcatc agccaggaca ccagagccca gtcgggtgga cggacggtac	120
gttctggaag ggaaagggcc ccgggaaggg gatacagcat tgagaagctc agaggctttg	180



gtctgggcat ccagaatgga ctttatctgg aggaggtgac atggcttctc gcctctggaa	240
gtgctgcttg gatctccggg acttcatgtc ctgactaggt ctggaagcgg tgaaaatagg	300
ggtaggaaaa aaggagagga ctgcaacaag gtcttcccga gtggcctgag ctcgaggagac	360
gagggagggtg caacgggtggg gagccgggcg caagggctgg gcggaggag ggggggggtc	420
tcctaagca gaaaggtggt attccatttt ctgggtagat ggtgaagatg cacctgaccg	480
agtctggtcg atctgaagat atcaggggaa aagatagtgc ggggtggaggg gagaatgaca	540
gaaccttcca gaaaatggga gaggctatag cacttgcaaa cccttcctg atctccgggg	600
actcccgaa gaagagggca ggtctgtggg cataggtgca gacttgccgg ggagctcttg	660
acggccgcgg gaagtggcaa cggcctgcga gctggccctt taaggcggct cgtaggcgtg	720
tcaggaaatg cgcgcagggc ccgcctgct cggtaagtgg ccggggacc gcgtcgtga	780
gccggaactt gaattcggct cgtggcaacc gcagggcctt gctccggtca ggccccgtc	840
cgtgtccctc gagacgcctt cctgagcctc ggtgatctcc ctgcagcacg ccctccttc	900
ggctctgcgg gtgcttccgg gggttccgc agcccatgct tcccacgcgg tccgctcca	960
gttatttcct cctccgctcc gtccttcctt cgctctctcg ctccctttct ccctgcgact	1020
cacgtgtccc ctgtcctcaa actggccatg gctgtcaaag cccacatcct tagttaggcc	1080
ccttctccct tccctgggtc ttgtttcgtg acaccacctc cctccccgc cccgggagcg	1140
agcaagatga ggagcgggtc acctcgcaa atccggaagc agaacttcat ccaagaagga	1200
ggggaccgat aggtcatccc atgtgacagt tgaaggctgc agccacagac ctagctgct	1260
tgaagccctg tagtccaggg actgcttctg gccgtaagg gaccagctc ttctgccacc	1320
atgaacaggg cgctctgaa gcggtccagg atcctgcgca tggcgtgac tggagtctct	1380
gctgtctccg aggagtcaga gagcgggaac aagccatttc tgctccgggc tctgcagatc	1440
gcgctggtgg tctctctcta ctgggtcacc tccatttcca tggatttct caacaagtac	1500
ctgctggaca gccctccct gcagctggat accccattt ttgtcacctt ctaccaatgc	1560
ctggtgacct cactgctgtg caagggcctc agcactctgg ccacctgctg ccccgcatg	1620
gtagacttcc ccacctaaa cctggacctc aaggtggccc gaagtgtgct gccgctgtca	1680
gtggtcttta tcggcatgat aaccttcaat aacctctgcc tcaagtacgt aggggtgccc	1740
ttctacaacg tgggacgctc gctcaccacc gtgttcaacg ttcttctctc ctacctgctg	1800
ctcaaacaga ccacttcctt ctatgccctg ctacactgcg gcgtcatcat tggtagtggtg	1860
gactgggggc gtggggagca ggaatcgtaa agatcaatac cacattactc attatctgtc	1920
ccaggtcttt tgcaccacca gtcataggga gagacctgta gagaacaaat aacttcctta	1980
ctgtgactca gtaagttagg gatccagcca aggtgaacat aataatgtta ggcagacact	2040
acagcaaagc cagccagaca ctcagatcta gctaagcatt tgagccatgt taatgtaacg	2100
gatccccatt acaaggatata atatagctgc gttttatgga gagaaacca aggcacagag	2160
aagctaagta gctgggatca cacaggtaat cactgacgta gcagaaattt gcacataagc	2220
agttacctcc ataggttaca ctcttgacca acacaccact gttctcaaga ggtcaagggt	2280
gaactcaggt catcacaatt ggcacaagta cctctacca ctgagccatt tcagtggctc	2340
agtcaatatg tgtgtgcttt aagaggcttt aactaccttc tcagatgtga ccataagtaa	2400
ttaattaccg ataggagcgt tgtgctgac attacacttg tagcatcctc tttattgtac	2460

ccataagctc	tctgagtggc	ggcatctctg	tgaacttgca	gctcggagag	gctgcgctcc	2520
ttgccacagc	cccacaacta	agaagcagat	agtctgggac	gcagtcccca	gttggtcata	2580
ctccctggcc	tgtgtttcaa	gccagtctgc	tttgctcctg	acccttggga	gttagcgcaa	2640
tgaaaaccaa	cactatcact	acagtctaaa	tgtgctttta	aatgaaagcc	caggaacttt	2700
gaagcatccg	gccccttaac	ggcagccact	atgtcctgat	tccgccaaca	tcttttcagt	2760
gcccggcagt	cacatggagc	aagggcctct	tggcttggac	agcatgtgtt	agggaacatg	2820
tttgccactt	tgaatgaatt	tagtggctgc	tgggttacag	agaccagggc	atctttcccc	2880
tcagagtcct	gaatgaacga	aaagcaacct	tcatttgtac	ctgctctgga	ttttagttcg	2940
tcttgttttg	cctatttaga	tgtccctggg	gtctctgagg	cccaggctgg	gtgctctaga	3000
tgtagggacc	aggccaacct	gtactgtctt	ccctagaaac	attgccctgg	ttgggcagct	3060
cctggatcca	gggttaaggg	gtctgggcgg	agagaggtca	gatagtggca	ggatgcctcc	3120
cactgcccc	acatacatac	cctaagagat	ctgggtactcc	tccttccagc	ctacaagcta	3180
ccgtggggtc	ccacttcagt	ccaccagccc	tgccaacggt	agaggggatg	ggcctcctag	3240
taggagaact	tacatgcagg	aaggtacagt	ctctggagaa	cctgagcccg	ggtccccaaa	3300
gggacaagta	gctgatagt	aggcagctga	gccccatggc	ggcctgcccc	agtggcacgg	3360
gaaagtggag	ctctctgctg	ccccactac	tggccccatc	tcttggctct	cccctccctt	3420
cctcctgtgg	agaaggccca	tctctgaaa	ggcctcctag	acatgcggca	ctttgcaaag	3480
cctgtcgggc	tcacagcccc	tctagggctt	aggaccttga	gaatgaagaa	tggagtcact	3540
tctagactct	agtggtaacc	accaggaggt	acagggtgct	ctgactgtgc	agggaacc	3600
accgtgggct	ctgctgagcc	aagtgcctgt	gaggctggag	agtctgggtc	ccttgttctg	3660
agatagcate	ttgtatgtt	gccctcaagt	ccaggcaac	tggggctgca	ggagcaccac	3720
cttgcctctc	tccagcttct	tgaagacttg	tacctttctc	ctagcagtct	ctatctgctc	3780
tcactccatc	cattgagcag	ctattagctt	gtggccaagt	atcttccagg	ccctgtactg	3840
agtttttaggg	tacaagtttg	agaaaggaag	ggtgggggtcc	ttgctcctgg	tccgtgaatg	3900
atgttgatgg	cagaaacgat	agttacacta	gatgctaagg	gctgtgggta	tctagaggga	3960
gcagggagca	tgtgggataa	cctgagcagg	cctagctgaa	aagtcattgc	tggcatgaga	4020
ctgctccagt	agtacaggct	gggaacacac	atctgaatgt	ttcctgaaga	cagttgggag	4080
ccacaggaaa	tatccactgt	agaaagatta	tttagttgta	agacagagta	gtagattggt	4140
taacatagta	gcaaaaacgt	ggccccagtt	tttacagatg	aagggaattg	gaactcagag	4200
aggttaaagta	acttctccca	agcagctcag	ctacaaaaat	cacagaacag	gcaggggcct	4260
gatggctctg	atgcctgtgc	tgggtccact	attccatgtt	gctaattcct	gcagcagcag	4320
taaacctctg	ccttgtggaa	atgaggagtc	taaataaaga	gaccatagca	ttgccacaag	4380
caggtttcta	ccaactgggg	gtggcaagga	atgctgtgtt	agcagcagga	agctgggaag	4440
aggctgagta	ctggggggat	gaggaaggga	tccccaggag	aggctgactt	tggccttgaa	4500
gaatgggtgga	gtccctggaa	agatgcagat	acacagagct	ctgtggatat	acagagaagt	4560
ggggagctaa	gtaggtggct	tggggccatc	atgtgacaga	ggaagtcggg	ctagatgcag	4620
gaagcccgtg	gctgtggcct	aggagagccat	gtaggttctt	tgagcagggg	gcgggggggg	4680
gggggggtga	cccaggagtg	actgtaaaca	acatcaggcc	atgagcagct	ctgacctaat	4740

gttctcacca	agggagccag	aaccaaggct	tagagccctg	tcccttttta	gtgtccaagg	4800
tcactttact	ggccctcttc	ctttacagct	gttggccccc	acaggccatc	aggcacctat	4860
gctattttat	tttatagcct	tcattacaat	gactacaatt	gtaattagag	agttgacagg	4920
gtcacatctg	tccttatata	ttccccctct	gctaagttct	gcctgggaga	atgtggaggg	4980
tattggtgaa	atttggggaa	gttataacce	ccccaccct	gccccaccc	cctgctttgc	5040
tccctttatc	tgcagggcat	ttctgtgccc	actttagccc	atatagctcc	caaataaatg	5100
acacagaaac	ctggtatttt	cattaacaaa	ctgctggcac	tctgctgggc	aggttctgag	5160
ctgttctaac	cctctaagct	gctaattgcc	agatagatgc	cccaatgctt	gccatccgag	5220
tctttctctg	gcttgctctg	ctccatgtgt	gacctcatgg	tgaatcctcc	tgatttcccc	5280
acatggcctc	tccacacttt	tccttctccc	ctctctctac	cagggaccct	ctcactggga	5340
cccgatgtcc	catctgtact	gtcctctccc	accagtcac	aggctgattg	agtcctttatt	5400
aaccaatcag	agatgatgga	aaaacagttt	ttacatagca	ctgaggatgg	agatgcttga	5460
cccttgagat	gcttgcccg	aacctgtact	gtatccagat	gtctgggccc	ccaaatcagc	5520
aggtgaatac	acagtacaca	ggactgaccc	ccaacagagg	gggaacacag	gttctcactc	5580
tgggctccac	gccctcggcc	ctttcttagt	gcaggggtta	gactttgtat	gtgttgatga	5640
tgaggtaagg	gccatggaac	agtcagaacg	gtggtgtcag	aatcctgtcc	ctctccctcc	5700
tgtctcatc	cctccttacc	gtgtcactct	tctgtctgtt	gcaggtgggt	tctggctggg	5760
tatagaccaa	gaaggagctg	agggaacctt	gtccctgacg	ggcaccatct	tcggggtgct	5820
ggccagcctc	tgcgtctccc	tcaatgccat	ctataccaag	aagggtgctcc	ctgcagtaga	5880
ccacagtatc	tggcgcctaa	ccttctataa	caatgtcaat	gcctgcgtgc	tcttcttgcc	5940
cctgatgata	gtgctggggc	agctccgtgc	cctcctggcc	ttcactcatc	tgagcagtgc	6000
ccacttctgg	ctcatgatga	cgctgggtgg	cctgtttggc	tttgccatcg	gctatgtgac	6060
aggactgcag	atcaaattca	ccagtcccct	gaccataac	gtgtcaggca	cggccaaggc	6120
ctgtgcacag	acagtgtctg	ccgtgtctta	ctacgaagag	attaagagct	tcctgtgggtg	6180
gacaagcaac	ctgatggtgc	tgggtgggtc	ctccgcctac	acctgggtca	ggggctggga	6240
gatgcagaag	accagggagg	acccagctc	caaagatggt	gagaagagtg	ctatcagggt	6300
gtgagctcct	tcaggggagcc	agggtgagc	tgggtgggg	cctgcccagc	acggaaggct	6360
tcccatagag	cctactgggt	atggccctga	gcaataatgt	ttacatcctt	ctcagaagac	6420
catctaagaa	gagccagggt	ctttctgat	aatgtcagaa	agctgcaaaa	tctcctgcct	6480
gccccatctt	ctagtcttgg	gaaagcccta	ccaggagtgg	cacccttcct	gcctcctcct	6540
ggggcctgtc	tacctccata	tgggtctctg	ggttggggcc	agctgcactc	tttgggcact	6600
ggactgatga	agtgatgtct	tactttctac	acaagggaga	tgggttgtga	ccctactata	6660
gctagttgaa	gggagctgtg	taacccaca	tctctggggc	cctgggcagg	tagcataata	6720
gctaggtgct	attaacatca	ataacacttc	agactacctt	tggaggcagt	tgggagctga	6780
gccgagagag	agagatggcc	attctgccct	cttctgtgtg	gatgggtatg	acagaccaac	6840
tgtccatggg	gtgactgaca	cctccacact	tcataatttc	aactttagaa	aagggggagc	6900
cacacgtttt	acagattaag	tggagtgtatg	aatgcctcta	cagcccctaa	ccccactttc	6960
cctgcctggc	ttctcttggc	ccagaagggc	caccatcctg	ttctccaaca	cctgaccag	7020

ctatctggct atactctctt tctgtactcc ctcccccttc cccccccat tagcctcctc	7080
cccaacacct ccactctcag gcaggaagtg ggggtccactc agcctctgtt cccatctgct	7140
tggacccctg agcctctcat gaaggtaggc ttatgttctc tgaggctggg gccggaggag	7200
cgcactgatt ctcgagatta tcccatcagg ctctgtcac aaaatagcct aggcctgtgtg	7260
tctaagaaca gtggagggtg gcttataact gttctggggg cagcgaagcc cacatcaagg	7320
tactcataga ccagtatatt ctgaggaaac ccctgtccac atcctcactt ggtaaaggca	7380
cagataatct cctcaggcc tcttgtatag gagcactagc cctgggaggg ctccgcccc	7440
tgacctgac accccaaagc cttcaacaga aggattccaa catgaatttg gggacagaag	7500
cactcagacc acgatgcca gcaccacacc ctctatcct cagggtagct gtcactgtcc	7560
tagtcccttc tgtttggcct ttgtaccct catttccttg gcgtcatgtt tgatgtcttt	7620
gtctctttcg tgagaagatg gggaaaccat gtcagcctct gcttccgact tcccatgggt	7680
tctaataaag ttggtggggc ctgatgccct gagttgtatg tgatttaata aaaaaaaaaat	7740
ttttttaaaa ac	7752

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 4039

&lt;212&gt; DNA

<213> *Cricetulus griseus*

&lt;400&gt; 100

gaacttcacc caagccatgt gacaattgaa ggctgtaccc ccagacccta acatcttgga	60
gccctgtaga ccagggagtg cttctggccg tgggggtgacc tagctcttct accaccatga	120
acagggcccc tctgaagcgg tccaggatcc tgcgcatggc gctgactgga ggctccactg	180
cctctgagga ggcagatgaa gacagcagga acaagccgtt tctgctgcgg gcgctgcaga	240
tcgcgctggt cgtctctctc tactgggtca cctccatctc catgggtattc ctcaacaagt	300
acctgctgga cagccccctc ctgcagctgg ataccctat cttcgtcact ttctaccaat	360
gcctgggtgac ctctctgctg tgcaagggcc tcagcactct ggccacctgc tgccctggca	420
ccgttgactt cccaccctg aacctggacc ttaagggtggc ccgcagcgtg ctgccactgt	480
cggtagtctt cattggcatg ataagtttca ataacctctg cctcaagtac gtaggggtgg	540
ccttctacaa cgtggggcgc tcgctcacca ccgtgttcaa tgtcttctg tcttacctgc	600
tgctcaaaca gaccatttc ttctatgcc tgctcacatg tggcatcatc attggtgagt	660
ggggcccggg ggctgtggga gcaggatggg catcgaactg aagccctaaa ggtcaacact	720
gtaggtacct ttacttactg tcccaggctc cttgcatcag cagttacagg aagagccctg	780
tagaaaacaa ataacttcct tatggtcatt caacaagtta gggaccagc cagggtgaaa	840
ataatgttag cagcaactac agcaaagatg gctctcgcca cttgcatgat taaaatgtgc	900
cagggtactca gatcyaagca ttggatccac attaactcaa ctaatcccta ttacaaggta	960
aaatatatcc gaattttaca gagggaaaac caaggcacag agaggctaag tagcttgacc	1020

aggatcacac	agctaataat	cactgacata	gctgggattt	aaacataagc	agttacctcc	1080
atagatcaca	ctatgaccac	catgccactg	ttccttctca	agagttccag	gatcctgtct	1140
gtccagttct	ctttaagag	gacaacacat	ctgacattgc	taccttgagg	taacatttga	1200
aatagtgggt	agacatatgt	tttaagtttt	attcttrctt	tttatgygtg	tgtgtttggg	1260
gggccaccac	agtgtatggg	tggagataag	gggacaactt	aagaattggg	cctttctccc	1320
accacatggg	tgctgaggtc	tgaactcagg	tcacaggat	tggcacaaat	ccctttaccc	1380
actgagccat	ttcactggtc	caatatatgt	gtgcttttaa	gaggctttaa	ctattttccc	1440
agatgtgaat	gtcctgtctga	tcattatccc	cttttacccg	gaagccctct	gggaggtgcc	1500
atccctgtgg	tcgtctgcat	acaaatgggg	aaactgcaac	tcagagaaac	aaggctactt	1560
gccagggccc	cacaagtaag	ataggctggg	atgccatccc	agactggcca	cactccctgg	1620
cctgtgcttc	aagccagttt	actttgttcc	tgccatttgg	aagttagcat	gttgacgtca	1680
aacacaataa	ctacaggcca	aaagtgcitt	taaattaaag	tcagatgaac	ttttaaacat	1740
ccagagctcc	tcaactgcag	gagttacaac	ctgattctgc	aaccatcttt	gcagtgcctg	1800
gtagtcatat	gtagctagag	gctcttggct	aggacagcat	gtgttaggaa	acatctggcc	1860
ctgagatcat	tgaattgagt	gactgctggg	tgacaaagac	caaggcatcc	gttccctgag	1920
agtcctgggc	aagcagcaat	gtgaccttca	tttgtacct	ctcaggttct	ttatctgtcc	1980
tgtttgacct	acttagtctc	ctctggtgtc	tcagaggccc	aggctgggta	ctctggatgt	2040
caggatcagg	ccaatgcgca	catctgccct	agaaatgtcc	ccctggttga	gcagctcctg	2100
aatccatcgg	taaagggtct	ggaccaggga	ggagtcagat	aaaaagctga	cagcactggg	2160
ggactccatg	gggaactccc	acctgcccc	acacatccat	cctaagagaa	ctggtattcc	2220
ttgtttcctc	tttgtcttac	aaggcaccct	gggatcccac	ttcagtctcc	cagccttgcc	2280
agggttagag	ggcatgagcc	tccttgtggg	gaatttagat	gcaagaaggt	acagtcacta	2340
gagaacctga	gctcagatcc	ccaaagtaac	cagtacctga	tagtgaggca	gctgagaacc	2400
gcagcagcct	gcctgagtgg	ctgaactctg	cggcctccgg	aactggcccc	aactgttggg	2460
tctcctcttc	cttctcctg	tgagggaggg	cccatctctg	ataagtctg	tggggactct	2520
agagtaggga	ggaggaggag	caatctaagc	aggccttact	gagaagtcct	tgctggcatg	2580
tggctgcctg	aggagtacag	actgggaaca	cccatttgaa	tgagtaaggt	ttttcctgaa	2640
ggccatgggg	agccacggag	gaaaatcatt	ttagttacaa	gacaaagagt	agatttggtta	2700
acatggggagc	arggacatgg	ccccatttt	cattgatgaa	ggaaattgga	actcrgagag	2760
gttaagtaac	ttctcccaaa	tagctcagct	tcataatcac	agaacagtca	gagtctagat	2820
ctctctgatg	cctgtgatgg	tcctgccatt	ccatgttgct	gatccctgtg	gcacagtaa	2880
gcctctacct	tgtgggaatg	caggatctaa	atgaagagag	raagtgtctg	ccccatgctg	2940
tggctctggaa	agctatgcag	gctctttgag	cagagagtga	cccacaagtg	aatagagtcc	3000
tatgagactc	aaagcaacat	ccacccttaa	gcagctctaa	ccaaatgctc	acactgaggg	3060
agccaaagcc	aagttagagt	cctgtgcttg	cccaaggctca	ctttgcctgg	ccctcctcct	3120
atagcaccgg	tgttatctta	tagccctcat	tacagtatt	acaattataa	ttagagaggt	3180
aacagggccca	cactgtcctt	acacattccc	ctgctagatt	gtagctggga	gagggggaga	3240
tgtaggtggc	tgggggagtg	ggagggaaga	tgcagatttt	cattctgggc	tctactccct	3300

cagccatttt ttggtgtggg agttagactt tggatatgtt gatgatgagg taagggccac	3360
agaacagtct gaactgtggt atcagaatcc tgtccctctc cctctctcct catccctctt	3420
caccttgtca ctctctgtgc tgetacaggt ggtttctggc tgggtataga ccaagaggga	3480
gctgagggca ccctgtccct cataggcacc atcttcgggg tgctggccag cctctgcgtc	3540
tccctcaatg ccatctatac caagaaggtg ctcccagcag tggacaacag catctggcgc	3600
ctaaccttct ataacaatgt caatgcctgt gtgctcttct tgcccctgat ggttctgtg	3660
ggtgagctcc gtgccctcct tgactttgct catctgtaca gtgccactt ctggctcatg	3720
atgacgctgg gtggcctctt cggctttgcc attggctatg tgacaggact gcagatcaaa	3780
ttcaccagtc ccctgaccca caatgtatca ggcacagcca aggcctgtgc gcagacagt	3840
ctggccgtgc tctactatga agagactaag agcttcctgt ggtggacaag caacctgatg	3900
gtgctgggtg gtcctcagc ctatacctgg gtcaggggct gggagatgca gaagacccaa	3960
gaggacccca gtcctaaaga gggtgagaag agtgctattg ggggtgtgagc ttcttcaggg	4020
acctgggact gaaccaag	4039

出願人又は代理人の書類記号 P044077	国際出願番号 PCT/JP03/04504
--------------------------	--------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
122	4
頁、 行	
B. 寄託の表示 <span style="float: right;">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 平成13年（2001）9月26日	受託番号 FERM BP-7756
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） <span style="float: right;">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）  EP	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 鈴木 玲子

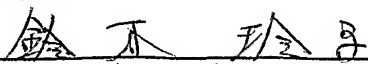
様式PCT/RO/134（1992年7月）

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐伸司

出願人又は代理人の書類記号 P044077	国際出願番号 PCT/JP 03/04504
--------------------------	---------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
122	4
頁、 行	
B. 寄託の表示 <span style="float: right;">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 平成13年（2001）9月26日	受託番号 FERM BP-7756
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） <span style="float: right;">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
オーストラリア特許法施行規則3.25の規定に基づき、 本願に関し、ブタペスト条約に従って寄託された物質の試料は、 本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前にのみ、 本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に 要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）  AU	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 

様式PCT/RO/134（1992年7月）

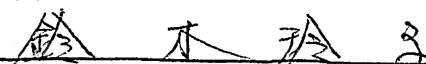
国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐 伸 司



出願人又は代理人の書類記号 P044077	国際出願番号 PCT/JP03/04504
--------------------------	--------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。  <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <span>122 頁、</span> <span>4 行</span> </div>	
B. 寄託の表示 <span style="float: right;">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）  日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 平成13年（2001）9月26日	受託番号 FERM BP-7756
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） <span style="float: right;">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
カナダ特許法サブセクション104(4)及び 同特許法規則160(4)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）  CA	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 


様式PCT/RO/134 (1992年7月)

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐 伸司

出願人又は代理人の書類記号 P044077	国際出願番号 PCT/JP 03/04504
--------------------------	---------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
148	30
頁、	行
B. 寄託の表示 <span style="float:right">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 平成15年（2003） 4月 1日	受託番号 FERM BP-8350
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） <span style="float:right">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）  EP	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	


受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 
様式PCT/RO/134 (1992年7月)

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐 伸司

出願人又は代理人の書類記号 PO44077	国際出願番号 PCT/JP 03/04504
--------------------------	---------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。  <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <span>148 頁、</span> <span>30 行</span> </div>	
B. 寄託の表示 <span style="float: right;">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）  日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 平成15年（2003） 4月 1日	受託番号 FERM BP-8350
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） <span style="float: right;">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
<p>オーストラリア特許法施行規則3.25の規定に基づき、 本願に関し、ブタペスト条約に従って寄託された物質の試料は、 本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前にのみ、 本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に 要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。</p>	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）  AU	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

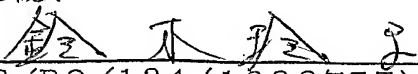
受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 
様式PCT/RO/134（1992年7月）

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐 伸司

出願人又は代理人の書類記号 PO44077	国際出願番号 PCT/JP03/04504
--------------------------	--------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
148	30
頁、 行	
B. 寄託の表示 <span style="float: right;">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 平成15年（2003） 4月 1日	受託番号 FERM BP-8350
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） <span style="float: right;">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
カナダ特許法サブセクション104(4)及び 同特許法規則160(4)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）  CA	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	


受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 
様式PCT/RO/134（1992年7月）

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐 伸司

出願人又は代理人の書類記号 PO44077	国際出願番号 PCT/JP03/04504
--------------------------	--------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
149	22
頁、	行
B. 寄託の表示 <span style="float:right">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 平成15年（2003） 4月 1日	受託番号 FERM BP-8351
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） <span style="float:right">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）  EP	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 

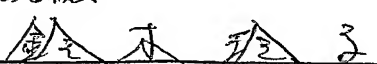
様式PCT/RO/134（1992年7月）

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐 伸司

出願人又は代理人の書類記号 P044077	国際出願番号 PCT/JP 03/04504
--------------------------	---------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
149 頁、	22 行
B. 寄託の表示 <span style="float: right;">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 平成15年（2003） 4月 1日	受託番号 FERM BP-8351
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） <span style="float: right;">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
オーストラリア特許法施行規則3.25の規定に基づき、 本願に関し、ブタペスト条約に従って寄託された物質の試料は、 本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前のみ、 本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に 要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）  AU	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 

様式PCT/RO/134（1992年7月）

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐 伸 司

出願人又は代理人の書類記号 P044077	国際出願番号 PCT/JP03/04504
--------------------------	--------------------------

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。	
149 頁、 22 行	
B. 寄託の表示 <span style="float: right;">他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/></span>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 平成15年（2003） 4月 1日	受託番号 FERM BP-8351
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） <span style="float: right;">この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/></span>	
カナダ特許法サブセクション104(4)及び 同特許法規則160(4)の規定に基づき、 微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、 試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）  CA	
E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

受理官庁記入欄
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した
権限のある職員 鈴木 玲子

様式PCT/RO/134（1992年7月）

国際事務局記入欄
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 02 MAY 2003 (02.05.03)
権限のある職員 五十嵐 伸司

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04504

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12P21/08, C12N15/09, C12N5/10, C07K16/18, G01N33/50,  
C07K16/46//A61K39/395, A61P9/00, A61P29/00, A61P31/04,  
A61P31/12, A61P31/14, A61P35/00, A61P37/02, A61P37/04,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12P21/08, C12N15/09, C12N5/10, C07K16/18, G01N33/50,  
C07K16/46

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	WO 00/61739 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 19 October, 2000 (19.10.00), & EP 117619 A1 & AU 3672800 A	1-4, 9-16, 21-25, 27, 29, 31, 33, 34, 36, 39-43, 45, 48/ 5-8, 17-20, 30, 32, 35, 37, 38, 44, 46, 47/ 26, 28
Y	Ripka J. et al., Two Chinese hamster ovary glycosylation mutants affected in the conversion of GDP-mannose to GDP-fucose, Arch.Biochem. Biophys., 1986, 249(2), pages 533 to 545	5-8, 17-20, 30, 32, 35, 38, 44, 47

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
23 May, 2003 (23.05.03)

Date of mailing of the international search report  
22 July, 2003 (22.07.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04504

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Shitara K. et al., A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells, J.Immunol.Methods, 1994, 167(1-2), pages 271 to 278	1-25, 30-45, 47, 48
X	Davies J. et al., Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII, Biotechnol.Bioeng., 2001, 74(4), pages 288 to 294	1, 27, 29
Y	Hackett J. Jr. et al., Recombinant mouse-human chimeric antibodies as calibrators in immunoassays that measure antibodies to Toxoplasma gondii, J. Clin.Microbiol., 1998, 36(5), pages 1277 to 1284	37, 46
Y	Elbashir SM. et al., Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, Nature, 2001, 411(6836), pages 494 to 498	5-8, 17-20, 30, 32, 35, 38, 44, 47
A	WO 97/27303 A (Toyobo Co., Ltd.), 31 July, 1997 (31.07.97), & US 6054304 A & EP 816503 A1 & JP 9-201191 A	1-48
A	Shields RL. et al., High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R, J.Biol.Chem., 2001, 276(9), pages 6591 to 6604	1-48
P,X	Shields RL. et al., Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity, J.Biol.Chem., 2002 Jul., 277(30), pages 26733 to 26740	1-48
P,X	SHINKAWA, T. et al., The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity, J.Biol.Chem., 2003, 278(5), pages 3466 to 3473	1-48
P,X	WO 02/31140 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 April, 2002 (18.04.02), & AU 9419801 A	1-48

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/04504

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup>      A61P37/08, A61P43/00, G01N33/15, (C12P21/08, C12R1:91),  
                  (C12N5/10, C12R1:91)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national  
classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup>

Minimum documentation searched (classification system followed by  
classification symbols)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12P 21/08, C12N 15/09, C12N 5/10, C07K 16/18, G01N33/50, C07K16/46 // A61K 39/395, A61P 9/00, A61P 29/00, A61P 31/04, A61P 31/12, A61P31/14, A61P 35/00, A61P 37/02, A61P 37/04, A61P 37/08, A61P 43/00, G01N 33/15, (C12P 21/08, C12R 1:91), (C12N 5/10, C12R 1:91)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12P 21/08, C12N 15/09, C12N 5/10, C07K 16/18, G01N33/50, C07K16/46

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	WO 00/61739 A1 (協和醗酵工業株式会社), 2000. 10. 19 & EP 117619 A1 & AU 3672800 A	1-4, 9-16, 21-25, 27, 29, 31, 33, 34, 36, 39-43, 45, 48 / 5-8, 17-20, 30, 32, 35, 37, 38, 44, 46, 47/26, 28
Y	Ripka J et al, Two Chinese hamster ovary glycosylation mutants affected in the conversion of GDP-mannose to GDP-fucose, Arch Biochem Biophys, 1986, 249 (2), p. 533-545	5-8, 17-20, 30, 32, 35, 38, 44, 47

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 05. 03

国際調査報告の発送日

22.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子



4 B

9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Shitara K et al, A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells, J Immunol Methods, 1994, 167(1-2), p. 271-278	1-25, 30-45, 47, 48
X	Davies J et al, Expression of GnTIII in a recombinant anti-C D20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII, Biotechnol Bioeng, 2001, 74(4), p. 288-294	1, 27, 29
Y	Hackett J Jr et al, Recombinant mouse-human chimeric antibodies as calibrators in immunoassays that measure antibodies to Toxoplasma gondii, J Clin Microbiol, 1998, 36(5), p. 1277-1284	37, 46
Y	Elbashir SM et al, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, Nature, 2001, 411(6836), p. 494-498	5-8, 17-20, 30, 32, 35, 38, 44, 47
A	WO 97/27303 A (東洋紡績株式会社), 1997. 7. 31 & US 6054304 A & EP 816503 A1 & JP 9-201191 A	1-48
A	Shields RL et al, High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R, J Biol Chem, 2001, 276(9), p. 6591-6604	1-48
PX	Shields RL et al, Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity, J Biol Chem, 2002 Jul, 277(30), p. 26733-26740	1-48
PX	Shinkawa T et al, The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity, J Biol Chem, 2003, 278(5), p. 3466-3473	1-48
PX	WO 02/31140 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2002. 04. 18 & AU 9419801 A	1-48